

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

TESE

**PERFIL DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS DE MÉIS BRASILEIROS
POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE**

REGINA LUCIA PELACHIM LIANDA

**Seropédica, Rio de Janeiro
Janeiro 2009**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**PERFIL DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS DE MÉIS BRASILEIROS
POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE**

REGINA LUCIA PELACHIM LIANDA

Sob a Orientação da Professora
Dra. Rosane Nora Castro
e co-Orientação da Professora
Dra. Aurea Echevarria

Tese submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Doutor em Química. Área de
concentração - Química dos
Produtos Naturais.

Seropédica, Rio de Janeiro
Janeiro 2009

547.632046

L693p

T

Lianda, Regina Lucia Pelachim,
1971-

Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação do potencial antioxidante/ Regina Lucia Pelachim Lianda. - 2009.

156f.

Orientador: Rosane Nora Castro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Química.

Bibliografia: f. 139-155.

1. Química orgânica - Teses. 2. Ácido fenólico - Teses. 3. Mel - Análise - Teses. 4. Antioxidantes - Teses. I. Castro, Rosane Nora, 1965-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em Química. III. Título.

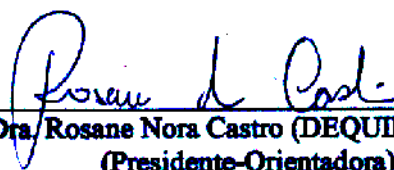
Bibliotecário: _____ Data: ____/____/____

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

REGINA LUCIA PELACHIM LIANDA

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Química como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor em Química, com área de concentração em Química dos Produtos Naturais.

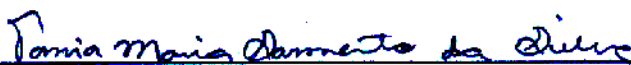
TESE APROVADA EM 23/01/2009



Prof. Dra. Rosane Nora Castro (DEQUIM-ICE-UFRRJ)
(Presidente-Orientadora)



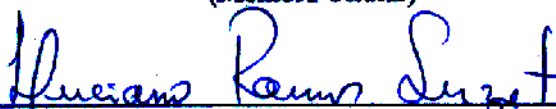
Prof. Dra. Aurea Echevarria (DEQUIM-ICE-UFRRJ)
(co-Orientadora)



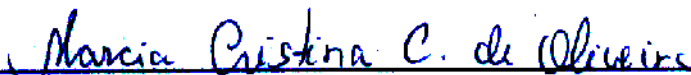
Prof. Dra. Tania Maria da Silva Sarmento (IQ-UFRPE)
(Membro Titular)



Prof. Dra. Gilda Guimarães Leitão (NPPN-UFRJ)
(Membro Titular)



Prof. Dr. Luciano Ramos Suzart (Universidade do Estado da Bahia)
(Membro Titular)



Prof. Dra. Márcia Cristina Campos Oliveira (DEQUIM-ICE-UFRRJ)
(Membro Titular)

Prof. Dra. Maria Cristina Affonso Lorenzon (IZ -UFRRJ)
(Membro Suplente)

À grande responsável por minha
vida ... minha mãe, Laurinda
Pelachin Lianda.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Roberto David Lianda e Laurinda Pelachin Lianda, que contribuíram para a minha formação e sempre permitiram que eu fosse eu mesma.

Ao meu companheiro Alexandre Ulisses Comitre, pelo incentivo, compreensão e amor.

A uma pessoa que admiro como um ser único e puro, Solange Cardoso.

À Prof^a Dra. Rosane Nora Castro pela orientação e dedicação, pelos ensinamentos, além da amizade e paciência.

À Prof^a Dra. Aurea Echevarria pela co-orientação e confiança, e também pela amizade.

À Prof^a Dra. Maria Cristina Lorenzon, coordenadora do Laboratório Abelha-Natureza-IZ-UFRRJ, pela colaboração, apoio e disponibilidade de seu laboratório durante a execução do trabalho de análise polínica.

À Dra. Leila Nunes Morgado, pesquisadora responsável do Laboratório Abelha-Natureza-IZ-UFRRJ, que pacientemente acompanhou o preparo do material para melissopalínologia, realizou a interpretação dos dados e forneceu o laudo da dominância dos tipos polínicos.

Ao Prof^o Dr. Juan Marioli da UNRC (Universidad Nacional de Rio Cuarto) – Córdoba - Argentina, pela colaboração na execução das análises por CLAE-DAD, com muita paciência e atenção.

À Prof^a Marta Pantoja da UFBA, que auxiliou na interpretação dos dados obtidos nos ensaios de fenóis totais.

À Prof^a Dra. Andressa Esteves-Souza e as doutorandas Kenia Pissinate e Ana Paula Oliveira Amorim responsáveis pelo aprendizado dos ensaios de atividade antioxidante e fenóis totais, além de suas amizades.

Aos Professores do PPGQ que, direta ou indiretamente, colaboraram com a minha formação, em especial ao Prof^o Dr. Mário Geraldo de Carvalho, pelo apoio e atenção.

À CAPES e FAPERJ pelo apoio financeiro.

Aos grandes amigos Prof^o Dr. Paulo Peixoto e Prof^a Dra. Ticiane Nascimento França, que são praticamente os responsáveis por esta conquista.

À grande amiga e companheira Andréa Rosane da Silva, que me tolerou em todos os momentos difíceis, principalmente, durante o período da ativa república. Também à amiga Ana Paula Rosa Lopes (a Aninha).

A todos os amigos do PPGQ ou não, que também contribuíram nessa jornada.

Ao amigo que muito respeito, que me trouxe pela primeira vez a esta Universidade, o Prof^o Miguel Teixeira dos Santos Neto.

... a Deus, por ter me dado força e saúde.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE QUADROS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 - A História da Apicultura e do Mel	1
1.2 - Composição Química e Propriedades do Mel	3
2 – AS SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS	7
2.1 - Rota Biossintética	7
2.2 – Distribuição nos Alimentos	14
2.2.1 - Substâncias bioativas dos alimentos funcionais	17
3 – AS SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS E AS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	20
3.1 – Atividade Antioxidante	22
3.1.1 – Atividade antioxidante de méis	26
4 – METODOLOGIAS USADAS PARA TIPIIFICAÇÃO DO MEL	31
4.1 - Melissopalinologia	31
4.2 – Análises Cromatográficas de Substâncias Fenólicas em Méis	34
5 – OBJETIVOS	41
5.1 – Objetivos Gerais	41
5.2 – Objetivos Específicos	41

6 - PARTE EXPERIMENTAL	42
6.1 – Material e Métodos	42
6.2 - Amostras de Méis	43
6.3 - Padrões Utilizados	45
6.4 - Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	46
6.5 - Obtenção do Extrato de Mel	46
6.6 – Determinação do Teor de Fenóis Totais nos Méis	48
6.6.1 – Preparo do reagente de Folin-Denis	49
6.6.2 – Preparo da curva analítica com ácido gálico	49
6.7 – Determinação do Teor de Flavonóides Totais nos Méis	50
6.7.1 – Preparo da curva analítica com quercetina	50
6.8 – Determinação da Atividade Antioxidante com DPPH	51
6.8.1 – Atividade antioxidante dos méis, dos extratos e dos padrões fenólicos	51
6.9 – Análise Melissopalinológica	55
6.9.1 – Preparo das lâminas para avaliação no microscópio	55
6.9.2 – Identificação dos tipos polínicos	55
7 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
7.1 – Estudo Melissopalinológico	57
7.2 – Avaliação da Atividade Antioxidante	61
7.2.1 – Avaliação da atividade antioxidante dos padrões fenólicos	61
7.2.2 – Avaliação da atividade antioxidante dos extratos dos méis	74
7.2.3 – Avaliação da atividade antioxidante dos méis	85
7.2.4 – Avaliação do teor de fenóis totais dos méis	96
7.2.5 – Avaliação do teor de flavonóides totais dos méis	98
7.3 – Análises das Substâncias Fenólicas	102

7.3.1 – Extração das substâncias fenólicas dos méis	102
7.3.2 – Perfis cromatográficos dos padrões fenólicos	103
7.3.2.1 – Considerações sobre as absorções no UV dos padrões	109
7.4 – Perfis das Substâncias Fenólicas nos Méis por CLAE-DAD	112
7.4.1 – Análises dos extratos dos méis silvestres	113
7.4.2 – Análises dos extratos dos méis de laranjeira	119
7.4.3 – Análises dos extratos dos méis de eucalipto	128
8 – CONCLUSÕES	137
9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139
10 – ANEXOS	156

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Composição fundamental do mel (WHITE, 1979)	4
Tabela 2. Bandas de absorção de flavonóides em solução metanólica e na presença de cloreto de alumínio (AlCl_3)	29
Tabela 3. Substâncias fenólicas identificadas nos méis de eucalipto e silvestres (DA SILVA, 2004 - UFRRJ)	38
Tabela 4. Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestres e de laranjeira (LIANDA, 2004 - UFRRJ)	38
Tabela 5. Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestres, de assa-peixe e de macieira (MONTAGNI, 2005 - UFRRJ)	39
Tabela 6. Substâncias fenólicas identificadas nas amostras de pólen apícolas (MONTAGNI, 2005 - UFRRJ)	39
Tabela 7. Amostras de méis analisadas nesse trabalho	44
Tabela 8. Amostras de méis selecionados para avaliação de atividade antioxidante e analisadas em trabalho anterior (LIANDA, 2004 - UFRRJ)	45
Tabela 9. Valores das absorvâncias (triplicata), médias e desvios padrão dos méis silvestres e de laranjeira, nos ensaios de Folin-Denis	48
Tabela 10. Valores das diferentes concentrações da solução do padrão de ácido gálico, com suas absorvâncias (triplicata), médias e desvios padrão, nos ensaios de Folin-Denis	49
Tabela 11. Valores das absorvâncias (triplicata), médias e desvios padrão, dos méis silvestres e de laranjeira nos ensaios com cloreto de alumínio	50
Tabela 12. Valores das diferentes concentrações da solução padrão de quercetina, com suas absorvâncias (triplicata), médias e desvios padrão, nos ensaios com cloreto de alumínio	51
Tabela 13. Valores de CE_{50} (μM e $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) obtidos para os padrões das substâncias fenólicas nos ensaios de atividade antioxidante pelo método do DPPH, suas médias e desvios padrão	53
Tabela 14. Valores de CE_{50} obtidos para os extratos de méis nos ensaios de atividade antioxidante pelo método do DPPH, suas médias e desvios padrão	54
Tabela 15. Valores de CE_{50} obtidos para os méis nos ensaios de atividade antioxidante pelo método do DPPH, suas médias e desvios padrão	54
Tabela 16. Resultados obtidos pelas análises dos tipos polínicos nos méis de eucalipto, realizadas no IZ-UFRRJ, 2008, laudo em anexo 2, p. 156	58
Tabela 17. Resultados obtidos pelas análises dos tipos polínicos nos méis de laranjeira, realizadas no IZ-UFRRJ, 2008, laudo em anexo 2, p. 156	59
Tabela 18. Valores das médias dos CE_{50} (μM e $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) obtidos para os padrões das substâncias fenólicas nos ensaios de atividade antioxidante pelo método do DPPH	74

Tabela 19. Valores das médias de CE ₅₀ obtidos para os extratos de méis nos ensaios de atividade antioxidante pelo método do DPPH	84
Tabela 20. Valores das médias de CE ₅₀ obtidos para os méis nos ensaios de atividade antioxidante pelo método do DPPH	95
Tabela 21. Valores das médias dos CE ₅₀ obtidos dos extratos e dos méis nos ensaios de atividade antioxidante pelo método do DPPH, em µg·mL ⁻¹ e mg·mL ⁻¹ , respectivamente	95
Tabela 22. Resultados obtidos para teor de fenóis totais para as amostras de méis, através do Reagente de Folin-Denis	97
Tabela 23. Valores obtidos para teores de flavonóides totais para as amostras de méis usando cloreto de alumínio	100
Tabela 24. Resultados dos teores de fenóis e flavonóides totais, CE ₅₀ dos extratos e dos méis	101
Tabela 25. Tempos de retenção (t _R) e comprimentos de onda (λ _{max}) das substâncias contidas na Mistura 1 analisadas por CLAE –DAD	104
Tabela 26. Tempos de retenção (t _R) e comprimentos de onda (λ _{max}) das substâncias contidas na Mistura 2 analisadas por CLAE-DAD	104
Tabela 27. Tempos de retenção (t _R) e comprimentos de onda (λ _{max}) das substâncias contidas na Mistura 3 analisadas por CLAE –DAD	105
Tabela 28. Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestres, de laranjeira e de eucalipto neste trabalho	135
Tabela 29. Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestres e de laranjeira em trabalho anterior (LIANDA, 2004)	136

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas do ácido chiquímico (1), do catecol (2) e do pirogalol (3)	7
Figura 2. Proposta biossintética para o ácido cinâmico (MANN, 1987)	8
Figura 3. Proposta biossintética para derivados do ácido cinâmico (MANN, 1987)	9
Figura 4. Estrutura do ácido clorogênico	9
Figura 5. Derivados de ácido benzóico de ocorrência natural	10
Figura 6. Biossíntese do ácido gálico (MANN, 1987)	11
Figura 7. Esqueleto básico dos flavonóides	11
Figura 8. Biossíntese dos flavonóides [E-1: chalcona sintase, E-2: chalcona isomerase, E-3: flavona sintase I (2-hidroxi flavanona sintase), E-4: flavona sintase II (2-hidroxi flavanona sintase), E-5: isoflavona sintase (2-hidroxi isoflavona sintase), E-6: flavanona-3-hidroxilase e E-7: flavonol sintase]; (DEWICK, 2001)]	13
Figura 9. Estruturas químicas de polifenóis comumente encontrados em alimentos	15
Figura 10. Estrutura química do radical DPPH (2,2-difenil-picril-hidrazil)	24
Figura 11. Flavonóides estudados quanto à atividade antioxidante (TSIMOGIANNIS & OREOPOULOU, 2006)	25
Figura 12. Formação da <i>orto</i> -quinona no anel B da quercetina	26
Figura 13. Complexo Flavonóide-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio	28
Figura 14. Espectros de absorção no UV (200-500 nm) para morina em metanol e morina com AlCl ₃ (LIANDA & CASTRO, 2008, anexo 1, p. 156)	29
Figura 15. Preparo e análises das amostras de méis	47
Figura 16. Esquema do ensaio de atividade antioxidante, utilizando o espectrofotômetro ELISA	52
Figura 17. Etapas de identificação dos grãos de pólen presentes no mel (http://www.webbee.org.br/pesquisa/melissopalino.htm)	56
Figura 18. Fotomicrografia de grãos de pólen de diferentes espécies vegetais (http://www.apicoltura2000.it/riviste/meditmelis.htm)	56
Figura 19. Fotografias das lâminas avaliadas ao microscópio contendo grãos de pólen A) <i>Eucalyptus</i> e B) <i>Citrus</i>	60
Figura 20. Morina agindo como sequestrador de radicais livres sendo estabilizado por ressonância	62
Figura 21. Ácido protocatecuico agindo como sequestrador de radicais livres formando <i>orto</i> -quinona	63
Figura 22. Ácido gálico agindo como sequestrador de radicais livres e formando <i>orto</i> -quinona	63
Figura 23. Ácido <i>para</i> -cumárico agindo como sequestrador de radicais livres, sem a formação da quinona	63

Figura 24. Gráfico que relaciona o percentual de atividade antioxidante e a concentração da quercetina no 1º ensaio	65
Figura 25. Gráfico que relaciona o percentual de atividade antioxidante e a concentração da quercetina no 2º ensaio	66
Figura 26. Gráfico que relaciona o percentual de atividade antioxidante e a concentração da quercetina no 3º ensaio	68
Figura 27. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração da morina , equações das retas e os seus valores de CE ₅₀ calculados para os três ensaios da triplicata	69
Figura 28. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração da rutina , equações das retas e os seus valores de CE ₅₀ calculados para os três ensaios da triplicata	70
Figura 29. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do ácido gálico , equações das retas e os seus valores de CE ₅₀ calculados para os três ensaios da triplicata	71
Figura 30. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do ácido protocatecuico , equações das retas e os seus valores de CE ₅₀ calculados para os três ensaios da triplicata	72
Figura 31. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do extrato RLS10 , equações das retas e os seus valores de CE ₅₀ calculados para os três ensaios da triplicata	75
Figura 32. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do extrato RLS12 , equações das retas e os seus valores de CE ₅₀ calculados para os três ensaios da triplicata	76
Figura 33. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do extrato RLS21 , equações das retas e os seus valores de CE ₅₀ calculados para os três ensaios da triplicata	77
Figura 34. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do extrato RLS23 , equações das retas e os seus valores de CE ₅₀ calculados para os três ensaios da triplicata	78
Figura 35. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do extrato RLL03 , equações das retas e os seus valores de CE ₅₀ calculados para os três ensaios da triplicata	79
Figura 36. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do extrato RLL15 , equações das retas e os seus valores de CE ₅₀ calculados para os três ensaios da triplicata	80
Figura 37. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do extrato RLL16 , equações das retas e os seus valores de CE ₅₀ calculados para os três ensaios da triplicata	81
Figura 38. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do extrato RLL18 , equações das retas e os seus valores de CE ₅₀ calculados para os três ensaios da triplicata	82

Figura 39. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do extrato RLL19 , equações das retas e os seus valores de CE ₅₀ calculados para os três ensaios da triplicata	83
Figura 40. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do mel RLS10 , equações das retas e os seus valores de CE ₅₀ calculados para os três ensaios da triplicata	86
Figura 41. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do mel RLS12 , equações das retas e os seus valores de CE ₅₀ calculados para os três ensaios da triplicata	87
Figura 42. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do mel RLS21 , equações das retas e os seus valores de CE ₅₀ calculados para os três ensaios da triplicata	88
Figura 43. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do mel RLS23 , equações das retas e os seus valores de CE ₅₀ calculados para os três ensaios da triplicata	89
Figura 44. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do mel RLL03 , equações das retas e os seus valores de CE ₅₀ calculados para os três ensaios da triplicata	90
Figura 45. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do mel RLL15 , equações das retas e os seus valores de CE ₅₀ calculados para os três ensaios da triplicata	91
Figura 46. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do mel RLL16 , equações das retas e os seus valores de CE ₅₀ calculados para os três ensaios da triplicata	92
Figura 47. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do mel RLL18 , equações das retas e os seus valores de CE ₅₀ calculados para os três ensaios da triplicata	93
Figura 48. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do mel RLL19 , equações das retas e os seus valores de CE ₅₀ calculados para os três ensaios da triplicata	94
Figura 49. Curva analítica da relação entre as médias das concentrações da solução do ácido gálico e as absorvâncias (760 nm), nos ensaios de Folin-Denis	96
Figura 50. Curva analítica da relação entre as médias das concentrações da solução de quercetina e as absorvâncias (415 nm), nos ensaios com cloreto de alumínio	99
Figura 51. Mistura 1 analisada por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 µm), fluxo de 0,2 mL.min ⁻¹ , fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), 200-400 nm	106
Figura 52. Mistura 2 analisada por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 µm), fluxo de 0,2 mL.min ⁻¹ , fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), 200-400 nm	107

Figura 53. Mistura 3 analisada por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 µm), fluxo de 0,2 mL.min ⁻¹ , fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), 200-400 nm	108
Figura 54. Espectros de absorção no UV dos ácidos <i>para</i> -hidroxibenzóico e cinâmico obtidos pelo detector de arranjo de fotodiodos	110
Figura 55. Esqueletos básicos de flavonóides	111
Figura 56. Análise da amostra RLS21 (extraída com acetato de etila) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 µm), fluxo de 0,2 mL.min ⁻¹ , fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), de 200-400 nm. NI – picos não identificados	114
Figura 57. Análise da amostra RLS23 (extraída com éter) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 µm), fluxo de 0,2 mL.min ⁻¹ , fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), 200-400 nm	116
Figura 58. Análise da amostra RLS24 (extraída com acetato de etila) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 µm), fluxo de 0,2 mL.min ⁻¹ , fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), 200-400 nm. NI – picos não identificados	118
Figura 59. Análise da amostra RLL28 (extraída com acetato de etila) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 µm), fluxo de 0,2 mL.min ⁻¹ , fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), 200-400 nm. NI – picos não identificados	120
Figura 60. Análise da amostra RLL29 (extraída com acetato de etila) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 µm), fluxo de 0,2 mL.min ⁻¹ , fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), 200-400 nm. NI – picos não identificados	121
Figura 61. Análise da amostra RLL30 (extraída com éter) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 µm), fluxo de 0,2 mL.min ⁻¹ , fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), 200-400 nm. NI – picos não identificados	122
Figura 62. Análise da amostra RLL31 (extraída com acetato de etila) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 µm), fluxo de 0,2 mL.min ⁻¹ , fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), 200-400 nm. NI – picos não identificados	123
Figura 63. Análise da amostra RLL32 (extraída com acetato de etila) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 µm), fluxo de 0,2 mL.min ⁻¹ , fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), 200-400 nm. NI – picos não identificados	124
Figura 64. Análise da amostra RLL40 (extraída com éter) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 µm), fluxo de 0,2 mL.min ⁻¹ , fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), 200-400 nm	126

Figura 65. Análise da amostra **RLL41** (extraída com acetato de etila) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 μ m), fluxo de 0,2 mL.min⁻¹, fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), 200-400 nm. NI – picos não identificados 127

Figura 66. Análise da amostra **RLE34** (extraída com acetato de etila) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 μ m), fluxo de 0,2 mL.min⁻¹, fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), 200-400 nm. NI – picos não identificados 129

Figura 67. Análise da amostra **RLE35** (extraída com éter) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 μ m), fluxo de 0,2 mL.min⁻¹, fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), 200-400 nm. NI – picos não identificados 130

Figura 68. Análise da amostra **RLE36** (extraída com acetato de etila) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 μ m), fluxo de 0,2 mL.min⁻¹, fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), 200-400 nm. NI – picos não identificados 131

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Esquema das leituras (absorvâncias) das amostras de quercetina em microplacas, as concentrações e valores de %AA, do 1º ensaio	64
Quadro 2. Esquema das leituras (absorvâncias) das amostras de quercetina em microplacas, as concentrações e valores de %AA, do 2º ensaio	66
Quadro 3. Esquema das leituras (absorvâncias) das amostras de quercetina em microplacas, as concentrações e valores de %AA, do 3º ensaio	67
Quadro 4. Esquema das leituras (absorvâncias) das amostras de ácido <i>para</i>-cumárico nas microplacas, as concentrações e valores de % AA nos três ensaios	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CCDA	-cromatografia de camada delgada analítica
CLAE	- cromatografia líquida de alta eficiência
CL	- cromatografia líquida
DAD	- detector de arranjo de fotodiodos
CP	- cromatografia em papel
CC	- cromatografia em coluna aberta
UV	- ultravioleta
EM	- espectrometria de massas
nm	- nanômetro
p.	- página
AcOEt	- acetato de etila
MeOH	- metanol
mL	- mililitro
min	- minutos
µm	- micrômetros
t _R	- tempo de retenção
R _f	- fator de retenção

RESUMO

LIANDA, Regina Lucia Pelachim. Perfil de Substâncias Fenólicas de Méis Brasileiros por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Avaliação do Potencial Antioxidante. **Seropédica, UFRRJ, 2009. 156 p. Tese de Doutorado em Química, Química dos Produtos Naturais.**

Avaliou-se a atividade antioxidante para quatro amostras de méis silvestres e cinco amostras de méis de laranjeira, cujos resultados se mostraram satisfatórios tanto para os méis quanto para seus extratos. Os teores de fenóis totais mostraram-se superiores para os méis heteroflorais (silvestres) em comparação com os homoflorais (laranjeiras). Os teores de flavonóides totais destas amostras não foram tão significativos quanto de fenóis, sugerindo que nos méis brasileiros os ácidos fenólicos são bem mais abundantes que os flavonóides. Os estudos realizados com as diferentes amostras de méis demonstraram que o conteúdo de compostos fenólicos foi mais elevado nos méis silvestres, o que explicaria a maior ação antioxidante, demonstrada pela atividade sequestradora de radical livre (CE₅₀) ter sido observado para essas amostras. Isto poderia fundamentar seu uso como alimento funcional.

Este trabalho descreve a identificação de ácidos fenólicos e flavonóides em amostras de méis silvestres, de eucalipto e de laranjeira obtidas de diferentes regiões geográficas. As amostras de méis foram analisadas por CLAE-DAD e UV-visível. Os resultados obtidos indicaram que existe uma grande variação no perfil dos compostos fenólicos nos diversos tipos de méis analisados. A análise do perfil cromatográfico associado ao estudo dos espectros de ultravioleta, permitiu identificar ácidos fenólicos e flavonóides em uma única corrida de 25 minutos. Para as amostras de méis silvestres foram identificados os ácidos protocatecuico, *para*-hidroxi-benzóico, vanílico, *para*-cumárico, *para*-metoxi-benzóico e cinâmico; e os flavonóides morina, quercetina, canferol e isoquercetina. Para as amostras de méis de eucalipto foram identificados os ácidos protocatecuico, *para*-hidroxi-benzóico e siríngico, além do flavonóide tricetina. E para as amostras de méis de laranjeira foram identificados os ácidos protocatecuico, *para*-hidroxi-benzóico e *para*-cumárico como os mais representativos, e os flavonóides morina, quercetina, rutina e isoquercetina. Esta foi a primeira vez que os flavonóides isoquercetina e canferol foram relatados em méis brasileiros. Além das análises químicas desenvolvidas nesse trabalho foi realizada também a análise polínica dos méis monoflorais (eucaliptos e laranjeiras), a fim de se poder definir e certificar a sua origem botânica e as suas propriedades. Levando-se em consideração na análise polínica de amostras de mel a participação de pólen anemófilo e polinífero, bem como a relação quantitativa entre o pólen das plantas nectaríferas e suas propriedades, obtém-se um diagnóstico que pode se aproximar da verdadeira procedência do mel.

Palavras chaves: Ácidos fenólicos, Flavonóides, Mel, CLAE, Atividade Antioxidante.

ABSTRACT

LIANDA, Regina Lucia Pelachim. **Phenolics Profile of Brazilian Honeys Through HPLC and Evaluation of Antioxidant Potential**. Seropédica, UFRRJ, 2009. 156 p. Tese de Doutorado em Química, Química dos Produtos Naturais.

The evaluation of the antioxidant activity was carried out for four samples of wild honeys and five samples of orange honeys and the results were satisfactory both for the honey samples as well as for their extracts. The total phenolic contents were found to be higher for the wild samples in comparison with the citrus honeys. Total flavonoid content was found to be much less significant than that of phenolics, suggesting that, as far as brazilian honeys are concerned, phenolics are more abundant than flavonoids. The fact that the wild honeys show higher contents of phenolics may explain the higher antioxidant activity of those honeys, as indicated by the radical uptake ability (EC_{50}). This ability could support their use as functional food.

This work describes the identification of phenolics and flavonoids in three samples of wild honeys, three samples of eucalyptus honeys and seven samples of citrus honeys from different geographical regions, including atlantic Forest. The samples were analyzed by HPLC-PDA and UV-VIS spectrometry. The results obtained show that there is a large variation in the phenolic profiles of the different samples. The analysis of the chromatographic profile and of the UV-VIS spectra at 230-400 nm allowed the identification of phenolic acids and flavonoids in a single run of 25 minutes. In the wild honey samples were identified protocatechuic, *para*-hydroxybenzoic, vanillic, *para*-coumaric, *para*-methoxybenzoic and cinnamic acids and the flavonoids morin, quercetin, kaempferol and isoquercetin. In the eucalyptus honeys were identified protocatechuic, *para*-hydroxybenzoic and syringic acids together with the flavonoid tricetin. Finally, in the samples of citrus honeys the main acids identified were protocatechuic, *para*-hydroxybenzoic and *para*-coumaric along with the flavonoids morin, quercetin, rutin and isoquercetin. This is the first report of the flavonoids isoquercetin and kaempferol (only one atlantic Forest sample) in brazilian honeys. Besides the chemical analyses described here, the polen analysis of the monofloral honeys (eucalyptus and citrus) were carried out in order to define and guarantee their botanical origin as well as their properties. Taking into consideration the participation of anemophilic and poliniferous polens as well as the quantitative relationship between nectariferous plants and their properties, a diagnosis is obtained which is very close to the real origin of the honey.

Keywords: Honey, Phenolic Acids, Flavonoids, HPLC, Antioxidant activity

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – A História da Apicultura e do Mel

O mel, que é usado como alimento pelo homem desde a pré-história, por vários séculos foi retirado dos enxames de forma extrativista e predatória, muitas vezes causando danos ao meio ambiente e matando as abelhas. Entretanto, com o tempo, o homem foi aprendendo a proteger seus enxames, a mantê-los em colméias racionais e manejá-los para obter maior produção de mel sem causar prejuízo para as abelhas. Nascia, assim, a apicultura (CAMARGO *et al.*, 2003). Essa atividade atravessou o tempo, ganhou o mundo e se tornou uma importante fonte de renda para várias famílias. Hoje, além do mel, é possível explorar, com a criação racional das abelhas, produtos como: pólen apícola, cera, própolis, geléia real, apitoxina, rainhas e polinização.

Muitas das terapias milenares de civilizações antigas utilizaram os produtos das abelhas como valioso recurso terapêutico e/ou conservativo. As histórias da medicina das civilizações tibetana, egípcia e greco-romana são muito ricas, todas contendo em seus escritos antigos, centenas de receitas onde são citados, principalmente mel, própolis, larvas de abelhas e às vezes as próprias abelhas, para curar ou prevenir enfermidades. Merece destaque a Bíblia Sagrada, oriunda da Civilização Hebraica, que em alguns textos enaltece ao mesmo tempo em que enobrece as propriedades alimentícias e medicinais do mel (PARK *et al.*, 2003).

Apesar dos egípcios serem considerados os pioneiros na criação de abelhas, a palavra colméia vem do grego, pois os gregos colocavam seus enxames em recipientes com forma de sino feitos de palha trançada chamada de *colmo*. Naquela época, as abelhas já assumiam tanta importância para o homem que eram consideradas sagradas para muitas civilizações. Com isso várias lendas e cultos surgiram a respeito desses insetos. Com o tempo, elas também passaram a assumir grande importância econômica e a ser consideradas um símbolo de poder para reis, rainhas, papas, cardeais, duques, condes e príncipes, fazendo parte de brasões, cetros, coroas, moedas, mantos reais, entre outros (O MEL, 2003; http://www.apicultura.com/index_sp.htm, 2007).

Conhecido desde a antiguidade, o mel foi durante muito tempo o único edulcorante usado pelo homem, até ser gradativamente substituído por açúcares refinados manufaturados, como aqueles extraídos da cana-de-açúcar e da beterraba (O MEL, 2003; http://www.apicultura.com/index_sp.htm, 2007).

Os primeiros imigrantes vindos ao Brasil no século dezanove, principalmente alemães, trouxeram consigo as abelhas, vulgarmente chamadas de "européias" (*Apis*), bem como a cultura de manipular e de tratá-las. Entretanto, o pasto para as abelhas aqui era diferente do europeu, logo, tanto o homem quanto as abelhas tiveram de aclimatar-se às novas condições de vida (O MEL, 2003; http://www.apicultura.com/index_sp.htm, 2007).

O mel é o produto mais importante da atividade apícola no Brasil, do ponto de vista quantitativo e econômico. A história do uso do mel está paralela à história do homem, e em cada cultura a evidência disto pode ser encontrada no seu uso como uma fonte de alimento e como um símbolo empregado em cerimônias religiosas, mágicas e terapêuticas (CARTLAND, 1970; CRANE, 1980; ZWAENEPREL, 1984).

Na legislação brasileira (Instrução Normativa nº 11, 20.10.2000) “entende-se por mel o produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou secreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam maturar nos favos da colméia” (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento -MAPA).

Embora o mel seja um alimento de alta qualidade nutricional (valor energético alto), apenas o seu consumo, mesmo em grandes quantidades, não é suficiente para atender a todas as nossas necessidades nutricionais. Suas propriedades sensoriais têm atraído milhares de consumidores (MOREIRA & DE MARIA, 2001).

Atrás dessa aparente simplicidade, esconde-se um dos produtos biológicos mais complexos. E o seu valor comercial está relacionado à sua origem floral, que é um dos principais parâmetros de qualidade. Alguns méis monoflorais são mais apreciados do que outros devido às suas propriedades de aroma e sabor, bem como atributos farmacológicos. O aroma é um dos atributos sensoriais mais atraentes para o consumidor.

A qualidade do mel depende de um lado de sua composição química, principalmente quanto aos diferentes tipos de açúcares, sais minerais e água. De outro lado, fazem parte do mel os grãos de pólen provenientes, na sua maior parte, das plantas fornecedoras de néctar, as chamadas plantas nectaríferas. Certa percentagem do pólen no mel pode ainda ser proveniente de plantas anemófilas, isto é, cujas flores não produzem néctar, somente pólen, disperso pelo vento, mas que pode ser de interesse para as abelhas como fonte nutricional. Há ainda, as chamadas plantas poliníferas que fornecem bastante pólen e podem oferecer pouco néctar. A maioria das plantas são poli-nectaríferas (*Eucalyptus*, *Vernonia*).

O mel é classificado, na maioria das vezes, de acordo com as plantas utilizadas na sua elaboração. As plantas nectaríferas compreendem um grande número de espécies variando de região para região (BARTH, 1989; 2004). Características físico-químicas constantes tais como consistência, cor, odor, sabor e aromas, ocorrem somente em méis chamados monoflorais ou uniflorais, isto é, aqueles procedentes, principalmente, do néctar de uma só espécie vegetal, por exemplo, mel de laranjeira, mel de eucalipto, etc. De outro lado estão os méis multiflorais, ou poliflorais, ou heteroflorais, também chamados de silvestres, não sendo constantes as suas características; são menos apreciados pelos consumidores. E ainda, os méis extraflorais, chamados de méis de melato (“honeydew”), são méis obtidos a partir de excreção de insetos sugadores de plantas, além dos méis de seiva (cana) (SAWYER, 1975).

Os méis florais podem ser identificados por análise microscópica que identifica e quantifica os grãos de pólen. Atualmente, existe um grande interesse em se caracterizar o mel através da análise polínica juntamente com a físico-química. A análise polínica depende de grande experiência por parte do analista já que se baseia na análise morfológica do pólen, a partir de descrições da literatura. Para que o nome da planta apícola possa ser citado na tipificação do mel, é necessário que tenha no mínimo 45% de dominância em grãos de pólen, e seja colhido, igualmente, de uma região com predominância floral na área de visitação das abelhas do apiário (LOUVEAUX *et al.*, 1978; BARTH, 1989). A ciência que identifica e quantifica os grãos de pólen no mel, para conhecer as fontes de néctar em cada região florístico-geográfica, e que estima a origem floral dos méis, é conhecida como Melissopalínologia.

O Brasil é, atualmente, o décimo-primeiro produtor mundial de mel, ficando atrás da China, Estados Unidos, Turquia, Argentina, México e Canadá (CAMARGO *et al.*, 2003).

A apicultura no Brasil tem se destacado como uma atividade de benefícios sociais, econômicos e ecológicos. Apesar da abundante e diversificada flora brasileira e da rusticidade das abelhas africanizadas representarem potencial para obtenção de mel e derivados de excelente qualidade, a apicultura tem muito para se desenvolver no país, e pouco ainda se sabe, sobre as propriedades e características do nosso produto. Assim, levando em conta a grande variedade do clima e da flora, extremamente rica no Brasil, a produção de mel e sua composição merecem especial atenção, de forma a direcionar o apoio para o controle e desenvolvimento da qualidade deste produto.

1.2 – Composição Química e Propriedades do Mel

O mel é uma mistura complexa de carboidratos, enzimas, ácidos aminados, ácidos, minerais, substâncias aromáticas, vitaminas, pigmentos, ceras e grãos de pólen. Ao todo já foram encontradas mais de 180 substâncias em diferentes tipos de méis (CRANE, 1996; WHITE, 1979). Sua composição, cor, aroma e sabor dependem, principalmente, das floradas, das regiões geográficas, do clima e da espécie de abelha (ANKLAM, 1998; FELSNER, 2001). Alguns dos componentes são devido à maturação do mel, alguns são adicionados pela abelha e alguns são derivados das plantas. Pequenas alterações na composição química do mel podem ser atribuídas aos efeitos de processamento e estocagem (TAN *et al.*, 1989a; FELSNER, 2001).

A variedade infinita é, de fato, uma grande atração do mel, e pode ser uma fonte rica de pesquisas e estudos. De um modo geral podemos dizer que o mel é constituído por três grupos de componentes essenciais: água (17%), glicídios (80%) e substâncias diversas (3%), como enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, flavonóides e matérias minerais. A Tabela 1 apresenta a composição fundamental do mel.

A fração monossacarídica do mel é composta basicamente pelos açúcares simples, glicose e frutose, numa proporção que varia de 22 % a 40,7 % para a glicose e de 27,2 % a 44,2 % para a frutose, de acordo com a florada. Já os méis de melato são pobres em ambas as hexoses (MOREIRA & DE MARIA 2001).

A glicose é um dos responsáveis pela granulação do mel, cuja tendência pode ser estimada pela relação G/A (glicose/água), e o teor de grãos de pólen também favorece a precipitação, além de outros fatores como por exemplo a agitação do mel (centrifugação, transporte). O maior problema resultante dessa precipitação de glicose é o aumento do teor de umidade da fase líquida que permite que células de leveduras osmofílicas (microrganismos, que se desenvolvem em condições de atividade de água baixa e concentração de glicídios alta), que ocorrem naturalmente no mel, se multipliquem e provoquem a fermentação do produto, com o aumento da acidez (MOREIRA & DE MARIA, 2001). A glicose pode ainda favorecer acidez ao mel pela ação da enzima glucose-oxidase, com formação de ácido glucônico, que constitui 70 a 90% dos ácidos orgânicos do mel.

Tabela 1. Composição fundamental do mel (WHITE, 1979).

Componentes	Média	Desvio padrão	Variação
Umidade (%)	17,2	1,46	13,4 - 22,9
Frutose (%)	38,19	2,07	27,25 - 44,26
Glicose (%)	31,28	3,03	22,03 - 40,75
Sacarose (%)	1,31	0,95	0,25 - 7,57
Maltose (%)	7,31	2,09	2,74 - 15,98
Açúcares totais (%)	1,50	1,03	0,13 - 8,49
Outros (%)	3,1	1,97	0,0 - 13,2
pH	3,91	-	3,42 - 6,10
Acidez livre (meq·kg ⁻¹)	22,03	8,22	6,75 - 47,19
Lactose (meq·kg ⁻¹)	7,11	3,52	0,00 - 18,76
Acidez total (meq·kg ⁻¹)	29,12	10,33	8,68 - 59,49
Lactose/Acidez livre	0,335	0,135	0,00 - 0,950
Cinzas (%)	0,169	0,15	0,020 - 1,028
Nitrogênio (%)	0,041	0,026	0,00 - 0,133
Diastase	20,8	9,76	2,1 - 61,2

Além da sacarose, diversos outros di e trissacarídeos são encontrados no mel. O dissacarídeo em maior proporção é a maltose, cujos teores podem variar de 1% a 16%, dependendo da florada e da região de origem (WHITE, 1979). O teor de sacarose em geral não ultrapassa 8%, sendo que uma taxa elevada pode indicar uma colheita prematura do mel, isto é, um produto em que a sacarose ainda não foi totalmente transformada em glicose e frutose pela ação da invertase (AZEREDO *et al.*, 1999).

A coloração do mel depende quase que, exclusivamente, da origem da flor, podendo ser claro, vermelho, dourado ou escuro. Dependendo da coloração, o sabor e o aroma sofrem alterações, preservando o valor nutritivo. Quanto mais escuro o mel, maior a quantidade de minerais este possui. Nos méis de diferentes origens botânicas foi encontrada predominância da cor clara sobre a escura. O peso total dos elementos minerais (teor de cinza total) varia de 0,02% a valores próximos de 1% (WHITE, 1979); e o principal mineral constituinte do mel é o potássio.

As enzimas presentes em maiores quantidades no mel são a invertase, amilase (diastase) e glucose-oxidase, produzidas nas glândulas hipofaríngeas das abelhas e

adicionadas ao néctar na vesícula melífera enquanto a abelha transporta o néctar ou melato para a colméia. A invertase promove a hidrólise da sacarose do alimento coletado em glicose e frutose. A diastase é a enzima que hidrolisa o amido e sua presença é um indicativo de qualidade. A glucose-oxidase, em soluções diluídas, reage com a glicose formando ácido glucônico e peróxido de hidrogênio, capaz de proteger o mel da ação bacteriana (LENGLER, 2004).

Os ácidos orgânicos (o pH médio em torno de 4) compreendem uma pequena porção do mel (cerca de 0,5 %) e a acidez total pode ser um indicador de fermentação. Sabe-se que o ácido glucônico está presente em maior quantidade. Já em menor quantidade, podem-se encontrar outros ácidos como: fórmico, acético, benzóico, butírico, láctico, oxálico, málico, succínico, pirúvico, glicólico, cítrico, fenilacético, tartárico, maleico, piroglutâmico e valérico (STRINSON *et al.*, 1960; WHITE, 1979; ANDRADE *et al.*, 1997; HUIDOBRO *et al.*, 2002).

Os derivados de ácidos fenólicos também devem ser destacados, visto que muitos deles são importantes por conferir aroma e sabor. Segundo Amiot *et al.* (1989) os compostos fenólicos de méis podem ser divididos em três grupos: ácidos benzóicos e seus ésteres; ácidos cinâmicos e seus ésteres e flavonóides livres. A proporção desses três grupos varia enormemente nos méis conforme as origens florais.

O mel contém menos que 0,3% de aminoácidos, sendo a prolina o mais abundante. O pólen é a principal fonte de aminoácidos, que também podem ser originados do néctar, do melato e das abelhas (WHITE, 1979). Wooton *et al.* (1976) constataram, em seis amostras de méis australianos, os seguintes aminoácidos livres: leucina, isoleucina, histidina, metionina, alanina, fenilalanina, glicina, ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutâmico, prolina, valina, cisteína, tirosina, lisina e arginina.

Embora em concentrações ínfimas, vitaminas, tais como: B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9, C e D também são encontradas no mel, sendo facilmente assimiláveis pela associação a outras substâncias como os carboidratos, sais minerais, oligoelementos, ácidos orgânicos e outros (CRANE, 1985).

O conteúdo de água do mel pode variar de 15 a 21%, sendo normalmente encontrados níveis de 17% (MENDES & COELHO, 1983). Apesar da legislação brasileira permitir um valor máximo de 20%, valores acima de 18% já podem comprometer sua qualidade final. Entretanto, níveis bem acima desses valores já foram encontrados por diversos pesquisadores em diferentes tipos de mel (CORTOPASSI-LAURINO & GELLY, 1991; AZEREDO *et al.*, 1999; MARCHINI, 2001).

Em condições especiais de níveis elevados de umidade, o mel pode fermentar pela ação de leveduras osmofílicas (tolerantes ao açúcar) presentes também em sua composição (CRANE, 1985).

Atividade enzimática poderia ser uma medida de exposição do mel ao aquecimento em processamento ou estocagem do mesmo. Entretanto, esse valor é menos exato do que o conteúdo de HMF (hidroximetilfurfural – que pode ser obtido pela hidrólise da frutose, devido ao aquecimento acima de 45°C), porque a atividade enzimática varia muito para diversos méis. Isso é devido ao fato de que diferente quantidade de saliva contendo enzimas pode ser adicionada pelas abelhas ao mel sob condições diversas. A atividade da enzima diastase em mel é relacionada ao tratamento de aquecimento (ANKLAM, 1998). De

qualquer forma, as concentrações de diastase e de HMF representam os parâmetros usados para avaliar o frescor do mel e algumas legislações usam somente o teor de diastase (SANCHO *et al.*, 1992). Segundo DE MARIA & MOREIRA (2003) o furfural é altamente reativo e, portanto, níveis mais baixos de furfural poderiam não refletir de maneira fidedigna o processamento inadequado do mel.

O mel, como uma fonte de antioxidantes, tem sido relatado como eficaz contra o escurecimento enzimático de frutas e vegetais (CHEN *et al.*, 2000), a deterioração oxidativa de alguns alimentos (McKIBBEN & ENGESETH, 2002) e no controle do crescimento de patógenos em alimentos (TAORMINA *et al.*, 2001). Propriedades antissépticas e antibacterianas também são atribuídas ao mel (RACOWSK *et al.*, 2007). Sua propriedade antibacteriana foi estudada por diversos autores (WHITE & SUBERS, 1963; CORTOPASSI-LAURINO & GELLY, 1991; COOPER *et al.*, 1999). Foram estudadas também suas ações fungicida (EFEM *et al.*, 1992), cicatrizante e promotora da epitelização das extremidades de feridas (EFEM, 1988).

Mais recentemente foi descoberto que o mel apresenta um efeito inibitório sobre aproximadamente 60 espécies de bactérias incluindo aeróbicas e anaeróbicas, gram-positivas e gram-negativas. Uma ação antifúngica foi também observada em algumas leveduras e espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* (MOLAN, 1992).

No contexto desse trabalho, ênfase foi dada para separação e caracterização das substâncias fenólicas encontradas nas amostras de méis brasileiros, em conformidade com trabalhos descritos anteriormente em nosso grupo (DA SILVA, 2004; LIANDA, 2004; MONTAGNI, 2005), bem como foram determinados os teores de compostos fenólicos e flavonóides totais das amostras dos méis e de seus extratos, além da avaliação do potencial antioxidante dessas amostras em relação a padrões comerciais.

Antes, porém, de relatar os resultados obtidos nesse trabalho, é importante apresentar dados da literatura demonstrando algumas importantes propriedades biológicas das substâncias fenólicas, tais como flavonóides e ácidos fenólicos em diferentes matrizes estudadas, ou seja, também em outros alimentos, como por exemplo, vegetais, frutas, sementes, condimentos e bebidas.

2 – AS SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS

2.1 - Rota Biossintética

Um dos aspectos fundamentais da química de produtos naturais é a biossíntese, que sugere os processos pelos quais as substâncias são sintetizadas nos organismos vivos vegetais. Os produtos do metabolismo especial de uma planta se dividem em grupos de substâncias que possuam semelhanças entre seus esqueletos básicos; cada um desses grupos tem origem de um precursor próprio, o que caracteriza a biogênese dos seus representantes.

O conhecimento do perfil químico aliado às propostas biossintéticas das diferentes classes de metabólitos da família vegetal em estudo é muito importante no processo de elucidação estrutural das substâncias. Assim, através deste conhecimento associado aos dados físicos obtidos de análises espectroscópicas, pode-se propor uma estrutura preliminar que auxilie na caracterização completa dos produtos naturais isolados.

Devido às observações acima, foi considerado importante descrever um pouco da rota biossintética dos derivados fenólicos, com enfoque especial para os derivados do ácido benzóico, do ácido cinâmico e os flavonóides, uma vez que estes são considerados possíveis marcadores biológicos presentes nos méis monoflorais e/ou heteroflorais, podendo então, auxiliar na determinação da origem botânica e/ou geográfica desses produtos apícolas.

Os ácidos fenólicos naturais sejam eles derivados do ácido benzóico ou do ácido cinâmico, têm a sua origem derivada da rota do ácido chiquímico.

O ácido chiquímico é o precursor de muitos constituintes químicos das plantas que contenham anel aromático em sua estrutura. As substâncias aromáticas derivadas do ácido chiquímico apresentam um padrão de hidroxilação do anel aromático que são semelhantes às estruturas do catecol ou do pirogalol (Figura 1).

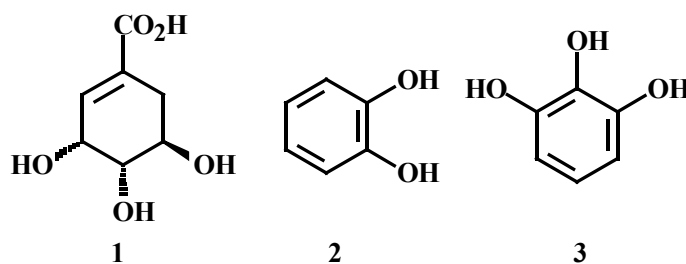


Figura 1. Estruturas do ácido chiquímico (1), do catecol (2) e do pirogalol (3).

A formação do ácido chiquímico procede dos precursores de três e quatro átomos de carbono, o fosfoenolpiruvato (PEP) e a eritrose-4-fosfato, respectivamente, através de uma série de etapas como ilustrado na Figura 2.

A reação do ácido chiquímico com fosfoenolpiruvato conduz a formação do chiquimato 3-fosfato, que sob a influência da enzima corismato sintase, sofre a perda de

ácido fosfórico produzindo o corismato. O corismato através da ação da enzima corismato mutase, sofre um rearranjo de Claisen para gerar o prefenato. Finalmente, a aminação redutiva do prefenato forma a fenilalanina, que é um aminoácido importante na construção de outras substâncias naturais, tais como as proteínas, alcalóides e o ácido cinâmico (substância com esqueleto C₆-C₃). O ácido cinâmico é formado a partir da fenilalanina, pela ação da enzima L-fenilalanina amônia liase (PAL), que é capaz de catalisar a remoção da amônia (Figura 2; MANN, 1987).

A importância do ácido cinâmico e de seus derivados ácido *para*-hidroxicinâmico (*para*-cumárico), ácido 3,4-diidroxi-cinâmico (ácido cafeico), ácido 4-hidroxi-3-metoxi-cinâmico (ácido ferúlico), ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxi-cinâmico (ácido sinápico) e ácido *para*-metoxi-cinâmico como constituintes naturais e como prováveis progenitores para a formação de outras substâncias contendo esqueleto do tipo C₆-C₃ foi descrita (DEWICK, 2001). A maioria desses derivados é formada a partir de processos oxidativos e/ou de reações de metilação (sendo estes derivados formados pela ação do cofator enzimático S-adenosil metionina-SAM) sobre o ácido cinâmico (Figura 3).

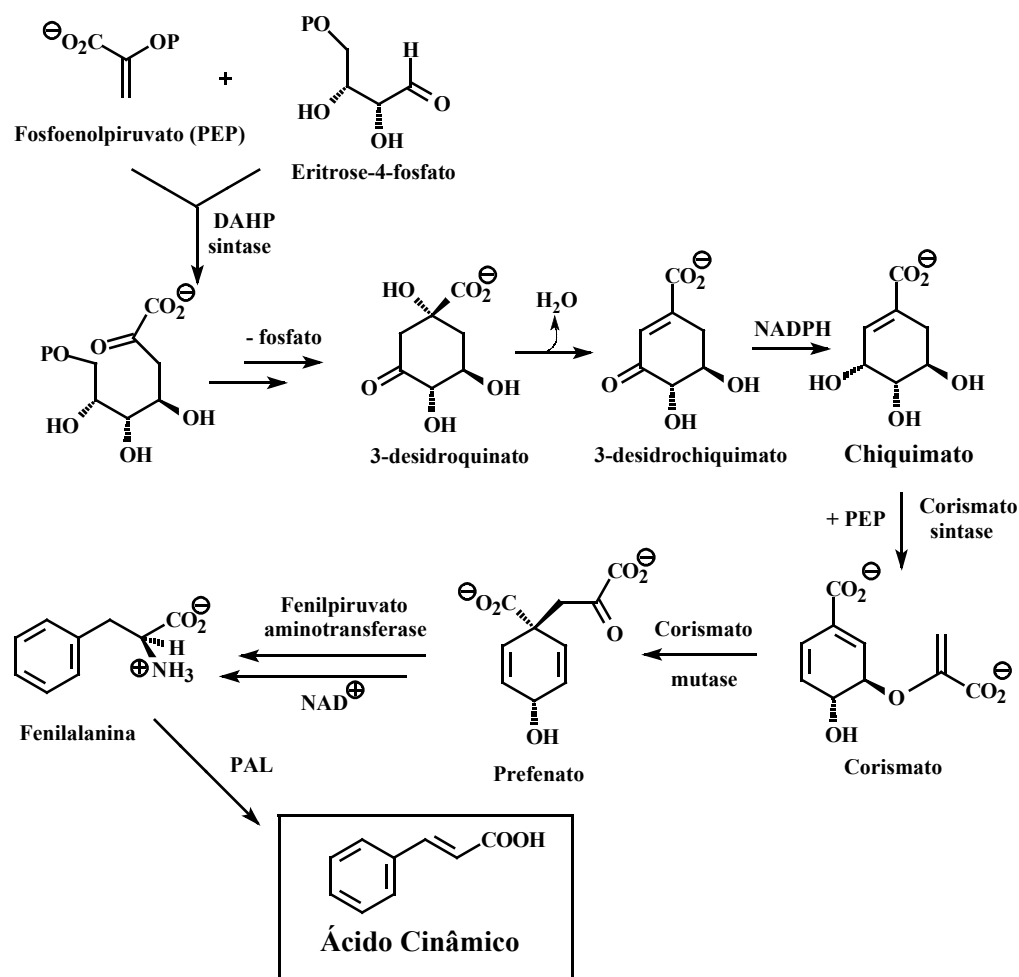


Figura 2. Proposta biossintética para o ácido cinâmico (MANN, 1987).

pela reação com unidades de malonil-CoA para formar classes de substâncias que possam ser representadas por $C_6-C_3(C_2)_n$.

O ácido benzóico e os seus derivados ácido *para*-hidroxi-benzóico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido protocatecuico, ácido gálico e ácido gentísico são também largamente distribuídos nas plantas superiores, e ocorrem geralmente, como ésteres alquílicos (-COOR) ou glicosídicos (-COO-gli: açúcares ligados à hidroxila fenólica). Na Figura 5 são mostrados alguns desses ácidos de ocorrência natural.

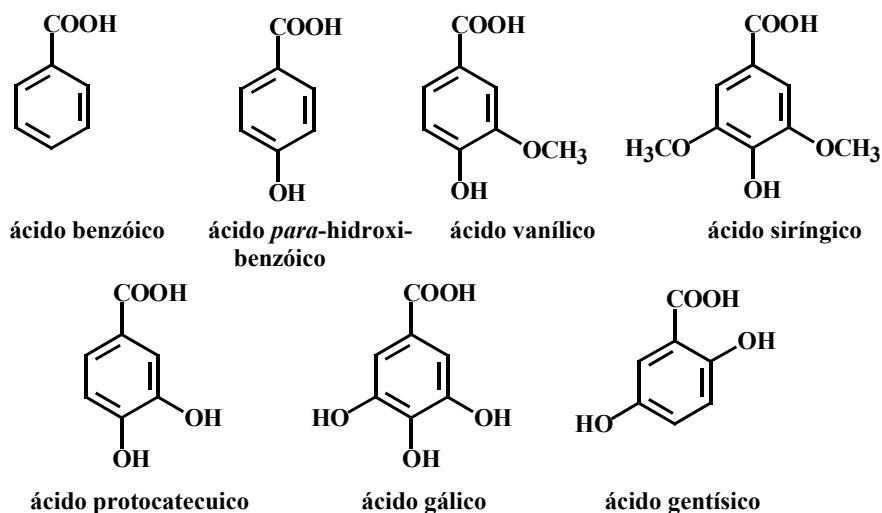


Figura 5. Derivados de ácido benzóico de ocorrência natural.

Dos ácidos mostrados na Figura 5, o ácido gálico é derivado do ácido 3-desidrochiquímico (intermediário do ácido chiquímico, Figura 6). O ácido protocatecuico pode ser formado pela degradação da fenilalanina e pela hidroxilação do ácido *para*-hidroxi-benzóico. A hidroxilação direta do ácido protocatecuico para formar o ácido gálico, embora rara, também é conhecida (Figura 6).

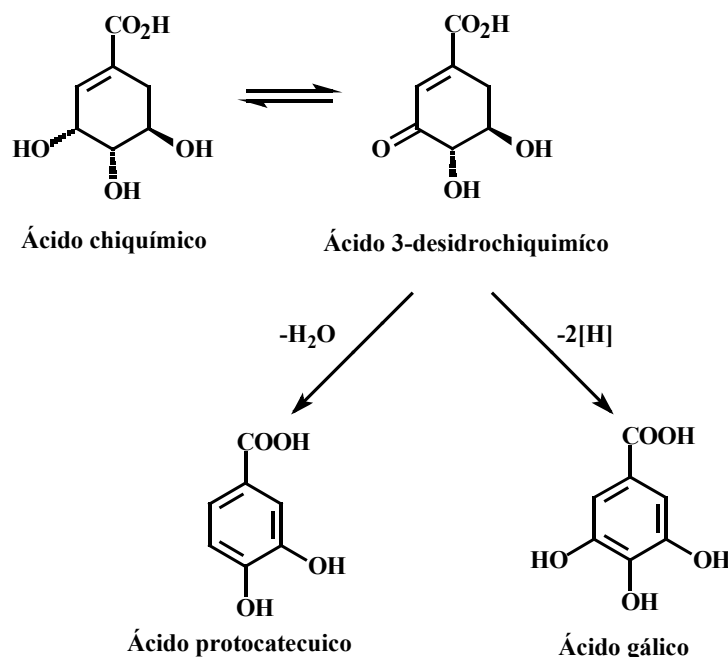


Figura 6. Biossíntese do ácido gálico (MANN, 1987).

Os ácidos *para*-hidroxibenzóico, vanílico, sirínico, protocatecuico e gentísico são originados da fenilalanina ou do ácido cinâmico. Similarmente, os ácidos ferúlico e sinápico podem ser convertidos ao ácido vanílico e sirínico, respectivamente, pela perda de uma unidade com dois átomos de carbono.

O esqueleto básico dos flavonóides, dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três átomos de carbono ($C_6-C_3-C_6$), resulta de rotas biossintéticas separadas: a do ácido chiquímico e a do acetato via ácido malônico. A via do ácido chiquímico origina a fenilalanina, precursor do ácido cinâmico, sendo este responsável pelo anel aromático **B** e a ponte de três carbonos. O outro anel aromático, anel **A** do esqueleto básico dos flavonóides é formado pela rota do acetato (Figura 7).

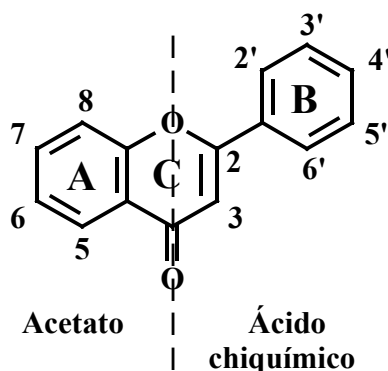


Figura 7. Esqueleto básico dos flavonóides.

O primeiro flavonóide formado na biossíntese é a chalcona e todas as outras formas são derivadas desta através de várias outras rotas (MARKHAN, 1982). A chalcona é formada pela condensação de 4-cumaroil CoA com três moléculas de malonil CoA, através da ação da chalcona sintase, enzima limítrofe da síntese de flavonóides, pois catalisa a formação do esqueleto C₁₅, e deste modo a entrada de hidroxicinamatos na biossíntese. A ciclização da chalcona durante a síntese da flavanona é catalisada pela chalcona isomerase encontrada fortemente complexada com a chalcona sintase. A flavanona é precursora de três diferentes classes de flavonóides, isto é; flavonas, isoflavonas e diidroflavonóis. Na formação das flavonas e flavonóis ocorre a introdução de uma ligação dupla entre C₂ e C₃. Dois passos são necessários para esta conversão onde são descritas duas flavonas sintase: flavona sintase I (dioxigenase) e flavona sintase II (monoxigenase). A monoxigenase dependente da citocromo P-450, que também catalisa a epoxidação para a formação das isoflavonas. Os diidroflavonóis são formados pela ação de uma flavanona-3-hidroxilase (DEY & HARBONE, 1997; HELDT, 1997). A Figura 8 indica as reações enzimáticas envolvidas na produção de algumas classes de flavonóides.

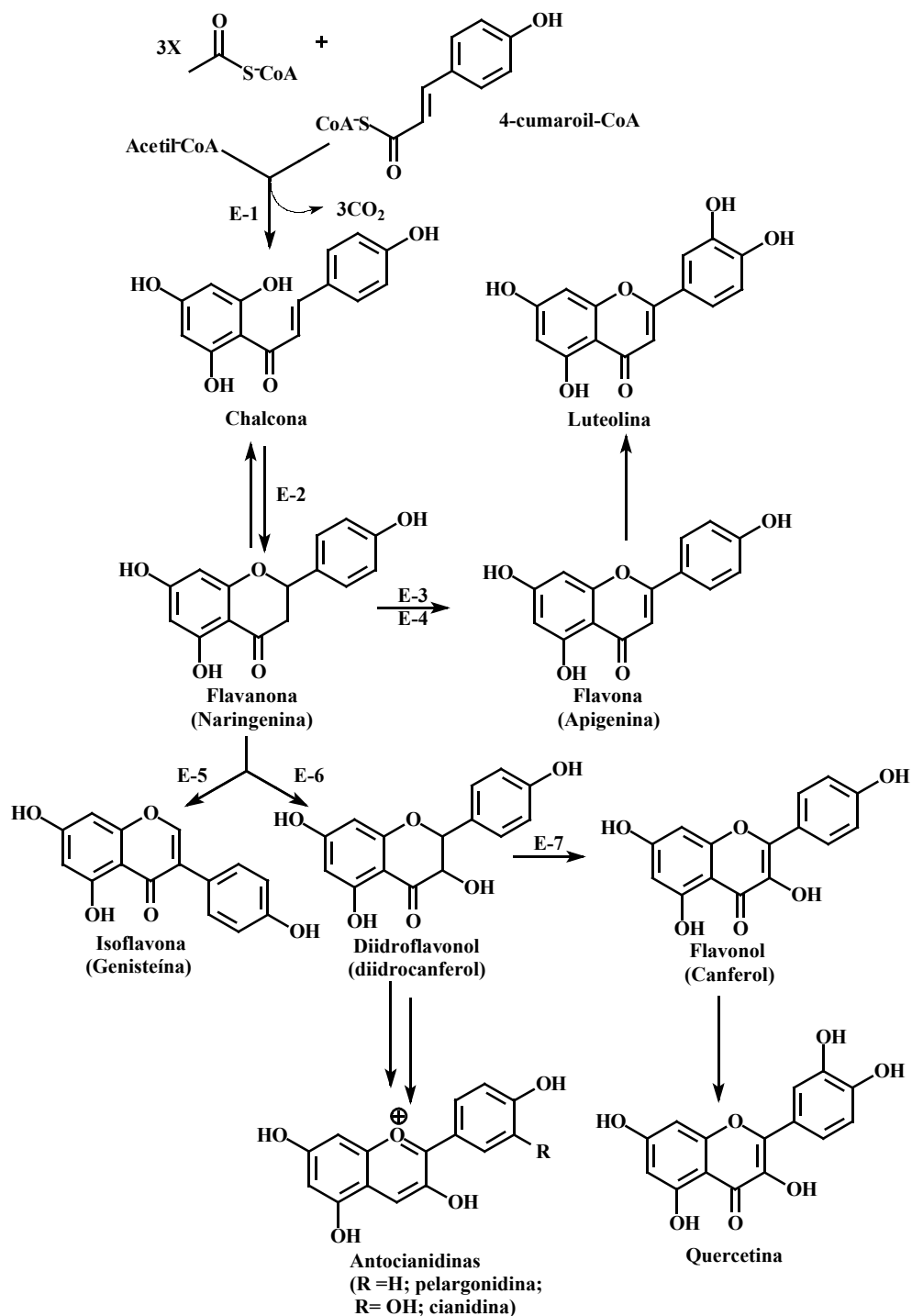


Figura 8. Biossíntese dos flavonóides [E-1: chalcona sintase, E-2: chalcona isomerase, E-3: flavona sintase I (2-hidroxiflavanona sintase), E-4: flavona sintase II (2-hidroxiflavanona sintase), E-5: isoflavona sintase (2-hidroxiiisoflavona sintase), E-6: flavanona-3-hidroxilase e E-7: flavonol sintase); (DEWICK, 2001)].

Outras modificações podem ocorrer em vários estágios, resultando em hidroxilação adicional (ou redução); metilação de grupos hidroxila ou do núcleo flavônico; isoprenilação de grupos hidroxila ou do núcleo flavônico; metilação de grupos diidroxilícos em posição *orto*; dimerização (para produzir bisflavonóides); formação de bissulfatos; e também, glicosilação de grupos hidroxila (para formar os flavonóides *O*-glucosídicos) ou do núcleo flavônico (para formar flavonóides *C*-glucosídicos) (MARCANO & MASAHISA, 1991; DEWICK, 1998).

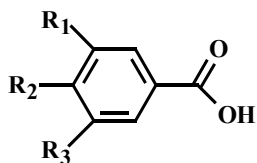
2.2 – Distribuição nos Alimentos

As substâncias fenólicas contribuem para as propriedades sensoriais (cor, aroma, adstringência) de frutas, mel, bebidas e vegetais. Essas substâncias são metabólitos especiais de plantas e estão, geralmente, envolvidos na defesa contra radiação UV ou agressão por patógenos. Contudo, várias matrizes têm sido estudadas como fontes de antioxidantes naturais potencialmente seguros em substituição aos artificiais, assim como de mais baixo custo de obtenção e alta eficiência em relação aos antioxidantes naturais que vêm sendo empregados na indústria de alimentos (ácido ascórbico e tocoferóis). Dos vários compostos que têm sido isolados, uma ampla faixa de polifenóis de plantas, apresentando propriedades antioxidantes tem sido estudada, e proposta para proteção contra oxidação lipídica (MOURE *et al.*, 2001).

Adicionalmente, nos últimos anos, pesquisas mostraram que o consumo de vegetais e bebidas ricos em polifenóis pode reduzir o risco do desenvolvimento de várias doenças (DUTHIE *et al.*, 2000; SÁNCHEZ-MORENO, 2002). Assim, vários estudos têm também analisado o potencial antioxidante de uma grande variedade de alimentos vegetais (semente de cacau, feijões, condimentos e frutas). Entre as bebidas, destacam-se o vinho tinto, o chá preto e o verde. Sementes como as de tamarindo, canola, gergelim, linhaça e girassol são outras fontes de antioxidantes naturais (DUTHIE *et al.*, 2000; MOURE *et al.*, 2001; SCALBERT & WILLIAMSON, 2000).

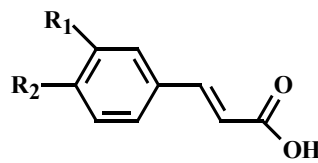
A Figura 9 mostra as estruturas químicas de alguns dos principais compostos fenólicos comumente encontrados em alimentos. Distinções devem ser feitas entre os ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e lignanas. Além dessa diversidade estrutural, os polifenóis podem estar associados ainda, com carboidratos, ácidos orgânicos e com outros fenóis (MANACH *et al.*, 2004).

ÁCIDOS HIDROXIBENZÓICOS



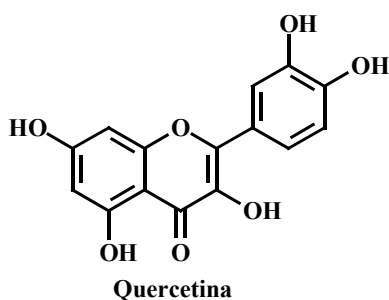
$R_1 = R_2 = \text{OH}; R_3 = \text{H}$; Ácido protocatecuico
 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$; Ácido gálico

ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS

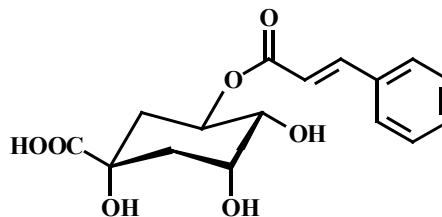


R_1 ou $R_2 = \text{OH}$; Ácido cumárico
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$; Ácido cafeico
 $R_1 = \text{OCH}_3; R_2 = \text{OH}$; Ácido ferúlico

FLAVONOL

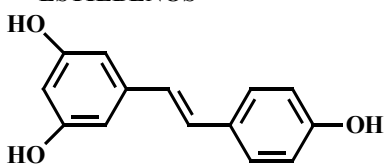


Quercetina



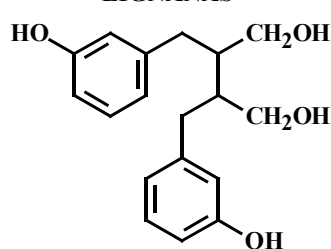
Ácido clorogênico

ESTILBENOS



Resveretrol

LIGNANAS



Enterodiol

Figura 9. Estruturas químicas de polifenóis comumente encontrados em alimentos.

Os ácidos fenólicos compreendem os derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico. O conteúdo dos ácidos hidroxibenzóicos nos alimentos é, geralmente, muito baixo, com exceção de certas frutas vermelhas, rabanete e cebola, que podem ter concentrações de algumas dezenas de mg/kg de peso fresco. Chá é uma importante fonte de ácido gálico, folhas de chá podem conter até $4,5 \text{ g kg}^{-1}$ de peso fresco. Geralmente, esses ácidos aparecem esterificados ou fazendo parte de estruturas mais complexas como a dos taninos (MANACH *et al.*, 2004).

Os ácidos hidroxicinâmicos são mais comuns do que os ácidos hidroxibenzóicos e consistem, principalmente, dos ácidos *para*-cumárico, cafeico, ferúlico e sinápico. Também podem ser encontrados livres ou esterificados nos alimentos. O ácido cafeico e o ácido quínico se combinam para formar o ácido clorogênico (Figura 4, p. 9), o qual é encontrado em muitos tipos de frutas e em altas concentrações no café (MANACH *et al.*, 2004). O

ácido cafeico, livre ou esterificado, é, geralmente, o ácido fenólico mais abundante e representa entre 75 e 100% do total do conteúdo de ácidos hidroxicinâmicos da maioria das frutas. Esses ácidos são encontrados em todas as partes da fruta, embora estejam em maiores concentrações nas partes menos maduras do fruto. As concentrações geralmente diminuem durante o processo de amadurecimento, porém as quantidades totais aumentam com o aumento do tamanho do fruto. O ácido ferúlico é o mais abundante encontrado em grãos cereais. O seu conteúdo em grão de trigo é aproximadamente $0,8-2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso seco, que pode representar até 90% do total de polifenóis. As farinhas de arroz e aveia contêm aproximadamente a mesma quantidade de ácidos fenólicos que a farinha de trigo, enquanto o conteúdo na farinha de milho é cerca de três vezes maior (MANACH *et al.*, 2004).

Apesar de se saber que muitos alimentos apresentam flavonóides e/ou ácidos fenólicos, e que estes são ingeridos na dieta diária dos seres vivos, o mecanismo de absorção digestiva e a biodisponibilidade dessas substâncias não estão ainda completamente explicados. Teoricamente, estas substâncias são pouco absorvidas na parte superior do trato digestivo e a sua digestão depende da presença de enzimas que podem quebrar as moléculas de flavonóides e transformá-los em ácidos fenólicos (MANACH *et al.*, 1995; WINTER, 1989).

Os flavonóides constituem uma larga família de pigmentos fenólicos encontradas nas plantas e alimentos. Eles estão geralmente presentes em baixas concentrações ($\sim 15-30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso fresco). Estes grupos de fenólicos são responsáveis pelas cores de muitas frutas e vegetais e são encontrados também em grãos, nozes, folhas e flores (COOK & SAMMAN, 1996). Portanto, são constituintes importantes na dieta humana, e embora não sejam considerados nutritivos, o interesse nessas substâncias nasceu por causa dos possíveis efeitos sobre a saúde humana, principalmente, as atividades antimicrobianas e anticâncer (HERTOG *et al.*, 1992).

A química dos flavonóides é complexa devido ao fato de na sua maioria corresponderem a formas conjugadas, ligando-se a açúcares ou mais grupos fenólicos. Os flavonóis e as flavonas ocorrem geralmente como glicosídeos, principalmente, nas folhas e outras partes das plantas acima da superfície do solo, pois sua biossíntese é estimulada pela luz (HERTOG *et al.*, 1992). Os flavonóis são os que mais se destacam nos alimentos, sendo os principais representantes a quercetina e o canferol (Figura 8, p. 13). As flavonas são menos comuns em frutas e vegetais e consistem, principalmente, dos glicosídeos de luteolina e apigenina (MANACH *et al.*, 2004).

As antocianinas são pigmentos dissolvidos na seiva dos tecidos das flores e frutas, que dão a coloração rosa, vermelho, azul ou violeta. Elas existem em diversas formas químicas, coloridas e não coloridas, de acordo com o pH. Embora sejam altamente instáveis na forma aglicona (antocianidinas), enquanto presentes nas plantas, são resistentes à luz, pH e condições de oxidação, que são suficientes para degradá-las. A degradação é diminuída pela glicosilação e pela esterificação com vários ácidos como o cítrico e o málico, além de ácidos fenólicos. Na dieta humana, as antocianidinas são encontradas nos vinhos tintos, em certas variedades de cereais e vegetais (rabanete, beterraba, cebola, etc), e são muito abundantes nas frutas. O conteúdo nos alimentos é, geralmente, proporcional a intensidade da cor e alcança valores de $2-4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso fresco. A cianidina (Figura 8, p.

13) tem sido descrita como a mais comum antocianidina em alimentos (MANACH *et al.*, 2004).

As frutas e as bebidas, tais como chá e os vinhos tintos, constituem a principal fonte de polifenóis. Certos polifenóis tais como a quercetina, são encontrados em vários tipos de matrizes (frutas, vegetais, cereais, leguminosas, sucos, chá, vinhos, mel, própolis, pólen, etc), enquanto outros são específicos de um tipo de alimento (flavanonas em frutas cítricas, isoflavonas em soja). Em muitos casos, os alimentos contêm misturas complexas de polifenóis de difícil caracterização. A maçã, por exemplo, contém monômero de flavonol ou oligômeros, ácido clorogênico e quantidades pequenas de outros ácidos hidroxycinâmicos, quercetina glicosilada e antocianidinas (MANACH *et al.*, 2004).

Há numerosos fatores que podem afetar o conteúdo de polifenóis nas plantas, que incluem amadurecimento no tempo de colheita, fatores ambientais, processamento e estocagem. Os fatores ambientais são os de maior efeito; esses fatores podem ser climáticos (tipo de solo, exposição ao sol, umidade, etc) ou agrônômicos (cultura em estufas ou campo, cultura biológica, cultura hidropônica, rendimento de frutas por árvore etc.). Exposição à luz tem um notável efeito sobre a maioria dos flavonóides. O grau de amadurecimento afeta consideravelmente as concentrações e proporções de vários polifenóis. Em geral, as concentrações dos ácidos fenólicos diminuem durante o amadurecimento, enquanto as concentrações de antocianinas aumentam (MANACH *et al.*, 2004).

Muitos polifenóis, especialmente os ácidos fenólicos, estão diretamente envolvidos na resposta de plantas a diferentes tipos de estresse, eles possuem propriedades antimicrobianas, e suas concentrações podem aumentar após infecção (PARR & BOLWELL, 2000). Embora poucos estudos estejam diretamente dirigidos para esse fim, o conteúdo de polifenóis de vegetais produzidos por agricultura orgânica ou sustentável é certamente maior do que daqueles vegetais cultivados sem estresse, tais como aqueles crescidos em condições hidropônicas ou convencionais. Isso foi mostrado recentemente em trabalhos realizados com morangos, amoras e milho (ASAMI *et al.*, 2003).

A estocagem pode, também, afetar o conteúdo de polifenóis que são facilmente oxidados. As reações de oxidação resultam na formação de mais ou menos substâncias polimerizadas, que levam a mudança na qualidade dos alimentos, particularmente, na cor e características organolépticas (MANACH *et al.*, 2004).

O mel contém nutrientes como carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídeos, vitaminas, além de ácidos fenólicos e flavonóides sendo um dos motivos para ser utilizado como alimento alternativo e/ou suplemento alimentar.

2.2.1 - Substâncias bioativas dos alimentos funcionais

Os compostos sintéticos, como, por exemplo, BHT (butil hidroxitolueno) e BHA (butil hidroxianisol), são antioxidantes eficientes e muito utilizados na indústria de alimentos, porém podem apresentar atividades mutagênicas (OSAWA *et al.*, 1990). Neste sentido, a procura de agentes antioxidantes naturais tem recebido atenção especial por parte dos pesquisadores de todo o mundo e da indústria alimentícia.

Sendo assim, devido à ampla divulgação pela imprensa em geral da relação entre alimentação e saúde, a preocupação da sociedade ocidental com os alimentos tem aumentado de forma exponencial. Uma grande quantidade de novos produtos que supostamente proporcionam saúde tem sido apresentada pela indústria alimentícia diariamente, e são considerados suplementos alimentares e/ou alimentos funcionais (ANJO, 2004).

Os alimentos funcionais fazem parte de uma nova concepção de alimento lançada pelo Japão na década de 80 através de um programa de governo que tinha como objetivo desenvolver alimentos saudáveis para uma população que envelhecia e apresentava uma grande expectativa de vida (ANJO, 2004). Sendo assim, alimentos funcionais são definidos como qualquer substância ou componente de um alimento que proporciona benefícios para a saúde, inclusive a prevenção e o tratamento de doenças. Esses produtos podem variar de nutrientes isolados, produtos de biotecnologia, suplementos dietéticos, alimentos geneticamente construídos até alimentos processados e derivados de plantas (POLLONIO, 2000).

Alguns parâmetros devem ser levados em conta em relação aos alimentos funcionais. Para Borges (2001), eles devem exercer um efeito metabólico ou fisiológico que contribua para a saúde física e para a redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas. Nesse sentido, devem fazer parte da alimentação comum e proporcionar efeitos positivos, obtidos com quantidades não tóxicas e que exerçam tais efeitos mesmo após a suspensão da ingestão e que não se destinem a tratar ou curar doenças, estando seu papel ligado à redução do risco de contrair doenças.

O uso da nomenclatura como alimentos medicinais, é utilizado quando estes se referem a doenças específicas, o que os diferencia dos alimentos funcionais. Os alimentos fortificados, aos quais é acrescentada alguma substância, podem ser considerados funcionais se os nutrientes essenciais forem adicionados aos alimentos comuns para fornecer benefícios saudáveis. Os suplementos dietéticos se diferenciam dos alimentos funcionais porque não podem substituir uma dieta diária e suas formas de apresentação estão mais próximas dos medicamentos (ARRABI, 2001).

Dentre as substâncias bioativas encontradas nos alimentos funcionais, destacam-se os terpenóides, que incluem carotenóides, limonóides, fitoesteróis e saponinas; os compostos nitrogenados (glucosinatos) e os metabólicos fenólicos, incluindo os ácidos fenólicos, polifenóis e flavonóides (CARAGAY, 1992). Estas substâncias são encontradas em frutas e verduras que podem ser ingeridas diariamente em determinadas quantidades e mostram potencial para modificar o metabolismo humano de maneira favorável à prevenção do câncer e de outras doenças degenerativas. Protegem contra a oxidação do LDL-colesterol através da redução de radicais livres, quelação de íons metálicos e regeneração de *alfa*-tocoferol. Atuam também contra alergias, inflamações, úlceras, virose, tumores e hepatotoxinas, e na inibição da agregação plaquetária, reduzindo as cardiopatias e trombozes e a síntese de estrógeno (GERMAN & DILLARD, 2000). Alguns alimentos possuem esses compostos em quantidade maior, destacando-se frutas cítricas, alho, repolho, soja, gengibre, cebola, tomate, berinjela, brócolis, couve-flor, aveia, cebolinha, menta, orégano, pepino, salsa e açafrão (MANACH *et al.*, 2004).

Consumir alimentos ricos em compostos nitrogenados é uma forma de proteção contra a carcinogênese e a mutagênese. Os glucosinatos contêm enxofre e estão presentes

em alimentos como brócolis, couve-flor, repolho, rabanete, palmito e alcaparra, sendo ativadores das enzimas de detoxificação do fígado (MITHEN *et al.*, 2000).

As antocianidinas são flavonóides solúveis em água e são consideradas antioxidantes *in vitro*, podendo apresentar propriedades antioxidante e antimutagênica *in vivo*. Catequinas, flavonóides, antocianinas e ácidos fenólicos estão presentes no vinho e apresentam ação antioxidante. A catequina, presente no chá verde é responsável pela proteção contra doença cardiovascular arterosclerótica.

Uma subclasse dos flavonóides são as isoflavonas, que atuam no combate ao câncer, diabetes, osteoporose, deficiência cognitiva, doenças cardiovasculares e efeitos da menopausa.

O grupo composto pelos ácidos graxos poliinsaturados, destacando as séries ômega 3 e 6, são encontrados em peixes de água fria (salmão), óleos vegetais, semente de linhaça, nozes e alguns tipos de vegetais. Esses compostos encontram-se relacionados com a prevenção de doenças cardiovasculares, através da redução dos níveis de triglicerídeos e colesterol sanguíneo, aumentando a fluidez sanguínea e reduzindo a pressão arterial (MACHADO & SANTIAGO, 2001).

Os oligossacarídeos e polissacarídeos são conhecidos como fibra alimentar. Os efeitos do seu uso são a redução de nível de colesterol sanguíneo e a diminuição do risco de desenvolvimento de câncer (KAY & STRASBERG, 1978).

3 - AS SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS E AS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Sabe-se que a atividade biológica das substâncias fenólicas é menos pronunciada do que a de outros grupos de substâncias, como por exemplo, os alcalóides ou os esteróides. Por esta razão, talvez, o valor terapêutico dos polifenóis foi, durante algum tempo, rodeado de dúvidas e controvérsias. No entanto, na última década, o interesse por essa classe de substâncias e os trabalhos que vem sendo desenvolvidos tem revelado importantes atividades biológicas.

Para melhor compreender a capacidade fisiológica dos compostos fenólicos, deve-se considerar que *in vitro* a capacidade antioxidante dos mesmos, varia não somente em função da estrutura química destas substâncias, mas também do tipo e polaridade do solvente empregado em sua extração, dos procedimentos de isolamento e da pureza dos compostos estudados, do substrato a ser protegido pelos antioxidantes, bem como se o ensaio será desenvolvido em sistema aquoso ou lipídico. Alguns estudos têm sugerido que o fator determinante da atividade antioxidante é a natureza lipofílica das moléculas e a afinidade do antioxidante por lipídios (MOURE *et al.*, 2001).

Quanto à solubilidade, os antioxidantes podem ser classificados em dois grupos: antioxidantes hidrofílicos, tais como vitamina C e a maioria dos compostos fenólicos, e antioxidantes lipofílicos, principalmente vitamina E e carotenóides (HUANG *et al.*, 2002).

Até cerca dos anos 50 eram escassos artigos que relatassem o mecanismo de ação dos flavonóides e ácidos fenólicos. Contudo, hoje, inúmeros trabalhos são descritos na literatura, destacando a variedade de atividades biológicas, tais como, a inibição da proteína quinase e APTase, ação antiproliferativa, antioxidante, antiviral, antifúngica, antimicrobiana, antibacteriana e antitumoral como as mencionadas por alguns autores (CROZIER *et al.*, 2000; WANWIMOLRUK *et al.*, 2001; NARAYANA *et al.*, 2001; MARCUCCI *et al.*, 2001; HOU *et al.*, 2003; MIORIN *et al.*, 2003; KAMPA *et al.*, 2004; ALJADI & KAMARUDDIN, 2004; CUSHNIE & LAMB, 2005).

Kampa e colaboradores (2004) investigaram a ação antiproliferativa e os efeitos apoptóticos de seis ácidos fenólicos (cafeico, siríngico, sinápico, protocatecuico, ferúlico e 3,4-diidroxifenilacético [PAA]) sobre células de câncer de mama. As substâncias testadas mostraram efeito inibitório (tempo-dependente e dose-dependente) sobre o crescimento da célula, com a seguinte potência: ácidos cafeico > ferúlico = protocatecuico = PAA > sinápico = siríngico.

Um estudo realizado com 27 diferentes fontes florais de mel e de diferentes localidades dos Estados Unidos analisou a capacidade do mel em inibir o crescimento de sete microrganismos patogênicos (*Alcaligenes faecalis*, *Aspergillus niger*, *Bacillus stercorophilus*, *Geotrichum candidum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Penicillium expansum*, *Pseudomonas fluorescens*) e cinco patógenos contaminantes (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* e *Staphylococcus aureus*) (MUNDO *et al.*, 2004).

Segundo Bogdanov (1997), as substâncias bactericidas são originárias das plantas, por este motivo causam capacidade inibitória nos diferentes méis uniflorais.

Segundo Molan (1992) e Wahdan (1998), os responsáveis por essa habilidade antimicrobiana são os fatores físicos, como sua alta osmolaridade e acidez, e os fatores

químicos relacionados com a presença de substâncias inibidoras, como o peróxido de hidrogênio, os flavonóides e ácidos fenólicos.

A principal substância antibacteriana do mel é o peróxido de hidrogênio, cuja quantidade presente no mel é dependente tanto dos níveis de glicose-oxidase, quanto de catalase, uma vez que a catalase destrói o peróxido de hidrogênio (WESTON *et al.*, 2000). Peróxido de hidrogênio é um agente antimicrobiano muito conhecido, inicialmente aclamado por suas propriedades bactericidas e desinfetantes quando foi utilizado pela primeira vez em atividades clínicas (TURNER, 1983).

Em trabalho realizado por Lianda (2004) em colaboração com o grupo da Profa. Dra. Aurea Echevarria, do Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, da UFRRJ, avaliou-se a atividade antitumoral *in vivo* e *in vitro* da fração rica em compostos fenólicos do mel silvestre proveniente da cidade de Itararé-SP, frente ao carcinoma de Ehrlich. A seleção desta amostra foi decorrente da presença dos ácidos protocatecuico e *para*-metoxi-cinâmico, além dos flavonóides morina e quercetina, identificados por CLAE-DAD. A fração do mel silvestre rica em compostos fenólicos mostrou resultados promissores para a atividade antitumoral indicando a importância desses metabólitos especiais. Os resultados obtidos na determinação preliminar da atividade antitumoral *in vivo* com o extrato da amostra selecionada (fração etérea), rica em substâncias fenólicas, mostraram significativa inibição do crescimento e aumento da sobrevivência dos animais, onde após 75 dias de tratamento 67% dos animais ficaram isentos de tumor. Isto tem estimulado o estudo de outras substâncias como potentes fármacos, que possam auxiliar na prevenção ou no combate ao câncer.

A presença do ácido protocatecuico chamou a atenção devido aos testes indicados por Kampa e colaboradores (2004) e a atividade antitumoral da quercetina (Figura 9, p. 14) frente ao carcinoma de Ehrlich (SUOLINA *et al.*, 1975; KANDASWAMI *et al.*, 1992) e carcinoma de cabeça (CASTILLO *et al.*, 1989).

Os flavonóides são estruturas polifenólicas de baixo peso molecular encontradas naturalmente nas plantas. Esses metabólitos especiais são de grande importância na manutenção da saúde de muitos animais herbívoros, incluindo o homem (KANASHIRO, 2001). Sabatier *et al.* (1992) detectaram alguns flavonóides presentes no mel de girassol (conhecidamente rico em flavonóides). Em maiores concentrações, foram encontrados os seguintes flavonóides: pinocembrina (5,7-diidroxiflavona), pinobanksina (3,5,7-triidroxiflavonona), crisina (5,7-diidroxiflavona), galangina (3,5,7-triidroxiflavona) e quercetina (3,5,7,3',4'-pentaidroxiflavona).

Ferreres *et al.* (1991) e Amiot *et al.* (1989), mostraram claramente a presença de flavonóides em mel. Entre os flavonóides presentes no mel, a flavanona pinocembrina tem sido relatada e estudada por sua atividade antibacteriana (BERAHIA *et al.*, 1993). Outros estudos também demonstraram a presença dos flavonóides pinobanksina (RIBEIRO-CAMPOS *et al.*, 1990), galangina e crisina (SABATIER *et al.*, 1992), canferol (FERRERES *et al.*, 1998) e ácido benzóico e cinâmico (WESTON *et al.*, 1999). De acordo com Martos *et al.* (2000a), Tomás-Barberán *et al.* (1993a; 1993b; 1994; 2001), Gómez-Caravaca *et al.*, 2006; Dimitrova *et al.*, 2007, Kenjeric *et al.*, 2008; Kahoun *et al.*, 2008 as análises de flavonóides e outros compostos fenólicos podem ser utilizadas para a determinação da origem botânica e autenticidade de cada tipo de mel. Os compostos fenólicos presentes no mel podem ser originados do néctar das flores, da própolis (TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 1993) e do pólen (FERRERES *et al.*, 1993).

3.1 – Atividade Antioxidante

Nos últimos anos, há um grande número de relatos sobre agentes antioxidantes e sua ação sobre proliferação de células cancerígenas. A grande maioria desses estudos tem se referido aos antioxidantes polifenólicos, por serem estes ativos em doenças crônicas degenerativas, incluindo doenças cardiovasculares e câncer. O uso de antioxidantes polifenólicos derivados de alimentos tem sido descrito, porém os mecanismos envolvidos nesses processos ainda não são muito claros.

O papel de radicais livres, tais como radical superóxido, radical hidroxila e outros, têm sido enfatizado em um número de doenças, incluindo câncer, doenças cardiovasculares, catarata, doenças inflamatórias gastrointestinais e outros processos inflamatórios.

Geralmente alimentos contêm antioxidantes naturais que podem sequestrar radicais livres. Moléculas pequenas antioxidantes, tais como vitamina C, vitamina E, e carotenóides têm gerado particular interesse como defensores contra doenças degenerativas. Entretanto, alguns estudos têm indicado que substâncias fenólicas, tais como flavonóides e ácidos fenólicos, são consideravelmente mais potentes antioxidantes que a vitamina C e a vitamina E. Outros estudos têm mostrado a alta correlação entre a atividade antioxidante total de algumas frutas e seu conteúdo fenólico (PRIOR, 2003). Também é reportada a ocorrência de substâncias fenólicas em legumes e sementes de legumes relacionando com a atividade antioxidante (SIDDHURAJU & BECKER, 2007).

Espécies reativas oxigenadas (ROS) podem interferir diretamente no crescimento celular. Os danos causados por espécies reativas oxigenadas podem induzir mitose, aumentando o risco de danificar DNA, e a divisão de células com danos irreparáveis ou mal-reparados levando a mutações (NIJVELDT *et al.*, 2001).

Os produtos alimentícios também se mostram susceptíveis a estes processos oxidativos (ROS), resultando em substâncias finais prejudiciais ou com características sensoriais indesejáveis, reduzindo com isso o prazo de validade dos produtos. A partir do início dos anos 80, o interesse em encontrar antioxidantes naturais para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico, tem aumentado consideravelmente, com o intuito de substituir antioxidantes sintéticos, os quais têm sido restringidos devido ao seu potencial de toxicidade (DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004).

As propriedades oncoprotetoras de antioxidantes endógenos têm sido documentadas em um número de estudos epidemiológicos e estudos *in vitro*. Antioxidantes endógenos são exclusivamente produzidos por plantas; eles são divididos em antioxidantes solúveis em água (exemplo vitamina C) e os lipossolúveis (exemplos: vitamina A, vitamina E e β -caroteno). Adicionalmente, uma rica classe de substâncias, porém heterogênea, são os polifenóis, caracterizados pela presença de um ou mais anéis fenólicos em sua estrutura, e que está presente também nas plantas. Exemplos dessas substâncias são os ácidos fenólicos simples (ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido sinápico, etc) ou os flavonóides (catequinas, quercetina, miricetina, etc; KAMPA *et al.*, 2004).

Tem sido indicado que os flavonóides como antioxidantes, podem inibir a carcinogênese. Alguns flavonóides tais como quercetina, apigenina e luteolina foram indicados como potentes inibidores de proliferação de células. Nijveldt e colaboradores (2001) relataram em seus trabalhos que a quercetina e apigenina inibiram o crescimento de

melanoma e influenciaram enormemente o potencial invasivo e metastático em camundongos.

Comparando as estruturas dos diferentes ácidos fenólicos (cafeico, siríngico, sinápico, protocatecuico, ferúlico e 3,4-diidroxifenilacético) estudados por Kampa e colaboradores (2004), os dados sugeriram que dois grupos hidroxila no anel fenólico e três carbonos na cadeia lateral eram ambos essenciais para a atividade antiproliferativa. A diminuição da cadeia lateral e/ou metilação de grupo(s) hidroxila produziram uma perda da atividade antiproliferativa.

Pouco se conhece sobre a absorção e metabolismo dos flavonóides. Acredita-se não serem tóxicos e, se absorvidos e ativos biologicamente *in vivo* podem prevenir radicais livres e peroxidação lipídica (LPO), que está associado com envelhecimento de células e doenças crônicas, tais como arteriosclerose e câncer. A LPO procede em três estágios: iniciação, propagação e terminação. Na iniciação, o radical livre abstrai hidrogênio de ácidos graxos poliinsaturados para formar o radical lipídico. Na propagação, o radical lipídico reage com oxigênio para formar o radical peroxi-lipídico que irá gerar mais radicais livres, então mantendo as reações em cadeia. No estágio de terminação, as espécies de radicais livres reagem entre si ou com antioxidantes para formar produtos inertes. A LPO pode ser suprimida por inativação enzimática de radicais livres e antioxidantes que inibem o estágio de iniciação e/ou aceleram o estágio de terminação. Os flavonóides inibem a LPO *in vitro* no estágio de iniciação agindo como sequestradores de ânions superóxidos e radicais hidroxilas, terminando as reações radicalares em cadeia por doação de átomos de hidrogênio para o radical peróxido, formando o radical flavonóide (menos reativo e mais estável). Este último desvia as reações com radicais livres terminando, então, a propagação em cadeia (COOK & SAMMAN, 1996; NIJVELDT *et al.*, 2001). Em seu trabalho Cook & Samman (1996) destacaram que a inibição de LPO era influenciada por diversos fatores estruturais dos flavonóides (Figuras 8, p. 13 e 9, p. 15), tais como:

- (i) a presença do grupo hidroxila na posição três do anel C. Exemplos de flavonóides agliconas nessas condições: canferol, quercetina, miricetina e morina (flavonóis);
- (ii) a ligação dupla entre os carbonos dois e três do anel C. A hidrogenação desta ligação diminui o efeito antiperoxidativo;
- (iii) o número de grupos hidroxilas; quanto maior o número de grupos hidroxilas nos anéis A e B, maior a atividade sequestradora de radicais livres;
- (iv) a presença de uma porção açúcar. A eficiência antiperoxidativa é diminuída nos grupos hidroxilas adjacente ao grupo glicosídeo devido ao impedimento estérico;
- (v) grupos metoxilas também diminuem a eficiência antiperoxidativa de flavonóides *in vitro* devido ao impedimento estérico; e
- (vi) flavonóides contendo grupo carbonila na posição quatro, e grupos hidroxilas nas posições três ou cinco, tais como quercetina, rutina, canferol, miricetina e morina, formam quelatos com íons metálicos.

A habilidade dos flavonóides para sequestrar íons metálicos pode contribuir para suas propriedades antiperoxidativas por prevenir a formação de radicais livres. Essa formação de quelatos é um mecanismo antioxidante dos flavonóides (COOK & SAMMAN, 1996).

Considerando esses diversos fatores estruturais dos flavonóides, TSIMOGIANNIS e OREOPOULOU (2006) examinaram o efeito dos elementos estruturais do anel C sobre a atividade seqüestradora de radicais de alguns desses compostos e o impacto da substituição di-hidroxi dos anéis A e B.

A eficiência das substâncias fenólicas como antioxidantes depende, em grande parte, da sua estrutura química, orientação relativa e do número de grupos hidroxilas ligados ao anel aromático (PAGANGA *et al.*, 1996).

A maioria dos métodos antioxidantes usados envolve a geração de espécies oxidantes, geralmente radicais livres, e sua concentração é monitorada na presença de antioxidantes que os seqüestram. Entre os métodos que empregam radicais livres orgânicos na avaliação de seqüestradores de radicais livres, o método do DPPH (2,2 difenil-1-picril-hidrazil, Figura 10) tem sido exaustivamente utilizado por vários autores, devido principalmente a sua simplicidade e rapidez (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995; ESTEVINHO *et al.*, 2008).

A molécula de DPPH é considerada um radical livre estável por apresentar um elétron livre que pode deslocalizar-se por toda a sua estrutura, e além do mais, não dimeriza facilmente como ocorre usualmente com os demais radicais livres. Esse efeito de ressonância que a molécula de DPPH apresenta resulta em uma coloração violeta escura, que é caracterizada por apresentar uma banda de absorção em cerca de 520 nm quando em solução de etanol ou metanol.

Quando a solução de DPPH é misturada com alguma substância que pode doar um radical hidrogênio, então a reação gera a sua forma reduzida com a perda da coloração violeta (embora seja esperado aparecer um resíduo de coloração amarela em virtude da presença do grupamento picril).

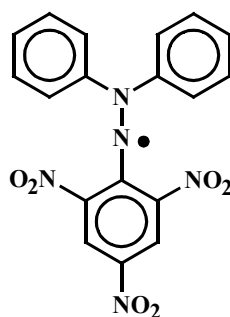


Figura 10. Estrutura química do radical DPPH (2,2–difenil-picril-hidrazil).

Os flavonóides quercetina, luteolina, taxifolina, eriodictiol, rutina, (+)-catequina, (-)-epicatequina, fisetina e canferol (Figura 11) foram estudados na reação com o radical livre DPPH, onde foram observadas duas etapas distintas de reação, a primeira rápida e a segunda mais lenta. O estágio rápido poderia ser possivelmente atribuído à presença das *orto*-hidroxilas no anel B muito reativas. Em tal caso a reação entre o flavonóide e o DPPH produz a *orto*-quinona menos ativa.

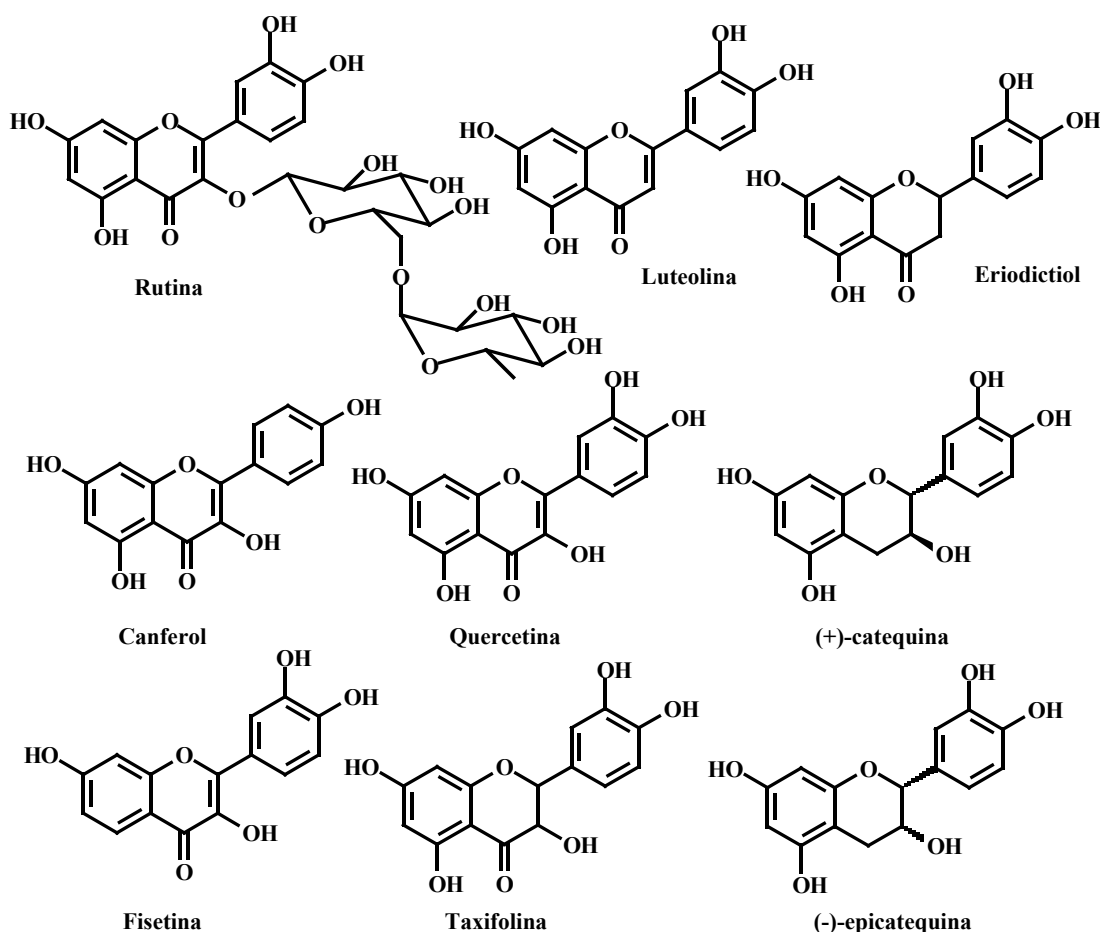


Figura 11. Flavonóides estudados quanto à atividade antioxidante (TSIMOGIANNIS & OREOPOULOU, 2006).

Quercetina e fisetina seqüestraram mais radicais por molécula, com a conseqüente produção de *orto*-quinona no anel B (Figura 12); essas estruturas apresentam duas hidroxilas *orto* no anel B, a dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 no anel C (permitindo formas canônicas adicionais) e a hidroxila no anel C. Os outros flavonóides apresentaram resultados similares entre si, seqüestrando, em média, a metade dos radicais livres que a quercetina e a fisetina. Comparando as estruturas, observa-se que nenhum dos outros compostos possui, simultaneamente, todas as características favoráveis apresentadas pela quercetina; e, quanto à fisetina, os autores notaram que a ausência da hidroxila na posição 5 não influenciou nos resultados, concluindo, portanto, que a substituição diidroxi do anel B

influencia bastante a atividade sequestradora, o que não ocorre com o anel A (TSIMOGLIANNIS & OREOPOULOU, 2006).

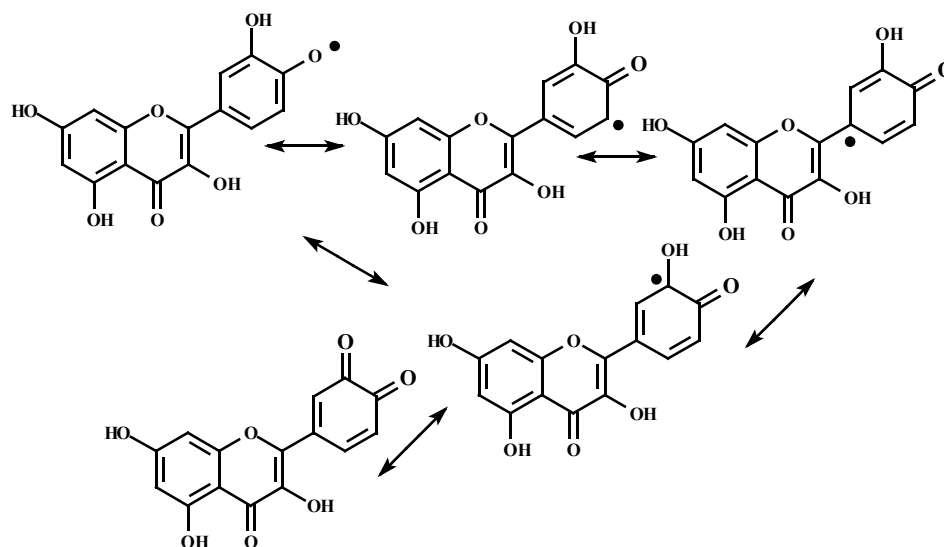


Figura 12. Formação da *orto*-quinona no anel **B** da quercetina.

Quercetina, canferol, morina, miricetina e rutina, por agirem como antioxidantes, exibem diversos efeitos benéficos, tais como antiinflamatório, antialérgico, antiviral bem como atividade anticâncer. Eles também têm sido sugeridos atuarem no papel protetor das doenças do fígado, catarata e doenças cardiovasculares (NARAYANA *et al.*, 2001).

3.1.1 – Atividade antioxidante de méis

Recentemente tem havido um aumento de interesse nos alimentos funcionais, isto é, alimentos que não somente cumprem as necessidades nutricionais básicas e energéticas, como adicionam efeitos fisiológicos benéficos. O consumidor atual prefere ingredientes de origem natural que ofereçam a funcionalidade ao alimento ao invés de origem artificial. Dentre as substâncias funcionais o grupo mais amplamente estudado é o dos antioxidantes (GÓMEZ-CARAVACA *et al.*, 2006).

Nutricionistas têm se interessado pelas substâncias fenólicas e flavonóides e o seu papel na dieta humana. Além das frutas e vegetais, o mel, pólen e a própolis podem ser uma boa fonte de antioxidantes naturais de interesse farmacológico (BERAHIA *et al.*, 1993).

O uso de mel no tratamento de lesões crônicas e úlceras diabéticas, indisposições gástricas, cataratas e outras doenças da visão, tem sido documentado também. Esse papel benéfico do mel foi parcialmente atribuído à sua atividade antibacteriana. Entretanto, desde que algumas doenças têm sido consideradas como consequência da presença de radicais livres, foi visto que parte do papel terapêutico do mel é devido à sua atividade

seqüestradora (antioxidante). O mel contém um número de componentes conhecidos como antioxidantes, incluindo vitaminas C e E, enzimas, tais como catalase e peroxidase, e compostos fenólicos. Prévios trabalhos têm indicado que a atividade antioxidante do mel varia muito, dependendo da origem floral (ALJADI & KAMARUDDIN, 2004).

Dois méis malasianos de *Apis mellifera* de origens florais diferentes (*Cocos nucifera* e *Melaleuca* spp.) foram estudados com o objetivo de avaliar a capacidade antioxidante e determinar a relação entre o conteúdo fenólico e essa atividade. A atividade antioxidante foi determinada em termos de seu poder anti-radical (PAR) avaliado pela análise seqüestradora de radical, usando 2,2-difenil-picrilhidrazil (DPPH; Figura 10, p. 24) como antioxidante. Essa atividade foi determinada espectrofotometricamente a 517 nm, onde a mudança de absorvância do DPPH foi avaliada. Alta correlação foi encontrada entre a atividade antioxidante total dos méis e seus conteúdos fenólicos, indicando que estes são os componentes responsáveis pelos efeitos antioxidantes do mel, apesar de, obviamente, outros fatores estarem envolvidos. Nesse trabalho, o mel *Melaleuca* apresentou atividade antioxidante significativamente maior do que o de *Cocos nucifera*. O mel *Melaleuca* mostrou conter alguns ácidos fenólicos, tais como ácidos gálico, ferúlico, cafeico, benzóico e cinâmico, enquanto o mel de coco apresentou os ácidos gálico, cafeico e benzóico, mais alguns outros compostos fenólicos desconhecidos. O valor terapêutico do mel é devido, em parte, à sua atividade antioxidante (ALJADI & KAMARUDDIN, 2004). Outros trabalhos utilizaram o método do DPPH para avaliação da atividade seqüestradora de radicais livres de méis (PÉREZ *et al.*, 2007; ESTEVINHO *et al.*, 2008).

Diversos métodos têm sido desenvolvidos, nos últimos anos, para avaliar a capacidade antioxidante de amostras biológicas. O conteúdo de fenóis totais e de flavonóides de amostras naturais, tais como plantas, alimentos e mel, refletem, em alguma extensão, a capacidade total antioxidante da amostra (MEDA *et al.*, 2005).

A maneira mais precisa e exata de se identificar e quantificar flavonóides em produtos naturais é a análise por cromatografia líquida de alta eficiência. Porém, uma das técnicas que se enquadra bem para a determinação de flavonóides totais é a espectrometria no ultravioleta (MEDA *et al.*, 2005).

O uso do cloreto de alumínio (AlCl_3) no diagnóstico da presença de alguns grupamentos químicos foi, pela primeira vez, empregado para antocianinas. Trata-se de uma classe de pigmentos do grupo dos flavonóides, encontrados principalmente em flores, mas muitas vezes também em frutos, e que dão ao órgão vegetal colorações que podem variar do vermelho ao azul, passando por todos os matizes intermediários. Em 1954, Harbone sugeriu o uso do cloreto de alumínio para a determinação espectrofotométrica da presença de certos grupamentos químicos em flavonóides (MABRY *et al.*, 1970). Da década de 60 em diante, o composto passou a ser largamente empregado como um reagente de deslocamento ("shift reagent") em espectrometria no UV-visível para a determinação estrutural de flavonóides (BRAZ-FILHO, 1971; MABRY *et al.*, 1970; MARKHAM, 1982).

O alumínio, como cátion, forma complexos estáveis com os flavonóides em metanol, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio batocrômico (para maiores comprimentos de onda) e uma intensificação da absorção. A estabilidade do complexo obtido deve-se à formação de um anel de seis membros estável através do átomo de alumínio com a hidroxila em C-5 e o grupo carbonila em C-4 (Figura 13). Dessa maneira, é possível determinar a quantidade de flavonóides, evitando-se a interferência de outras

substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que invariavelmente acompanham os flavonóides nos tecidos vegetais. A leitura é feita em espectrofotômetro a 415 nm, utilizando-se cloreto de alumínio a 2% em metanol (WOISKY, 1996; WOISKY & SALATINO, 1998; MEDA *et al.*, 2005). Nessas condições, o complexo flavonóide-Al (Figura 13) absorve mais intensamente e em comprimento de onda maior do que o flavonóide sem a presença do agente complexante; os desvios de alguns tipos de flavonóides estão especificados na Tabela 2 e na Figura 14 estão apresentados, como exemplos, os espectros do flavonol morina na presença e ausência do cloreto de alumínio (LIANDA & CASTRO, 2008, anexo 1, p. 156). Os ácidos fenólicos, mesmo os que formam complexos com $AlCl_3$, absorvem em comprimentos de onda muito inferiores, evitando-se dessa maneira interferências nas medidas de absorbância. O uso do cloreto de alumínio para a determinação da quantidade de flavonóides totais não é, no entanto, um procedimento isento de limitações. O método é preciso, isto é, ele é reproduzível, fornecendo desvios muito pequenos ou nulos entre um ensaio e outro com a mesma amostra. No entanto, ele pode ser pouco exato, ou seja, o valor que ele fornece pode ser diferente (geralmente inferior) em relação à quantidade de flavonóides totais realmente presente na amostra analisada. O valor medido e o valor real são tanto mais próximos entre si quanto maior a proporção de flavonóis na amostra, e tanto mais distantes quanto maior a proporção de flavonas. Isso se deve ao fato de que o comprimento de onda selecionado (415 nm) corresponde à banda de absorção do complexo quercetina-Al. A quercetina é um flavonol, certamente o mais comum dos flavonóides encontrado nas plantas. Os complexos dos outros flavonóis com alumínio absorvem bem próximo de 425 nm, mas os complexos derivados de flavonas absorvem em comprimentos de onda inferiores, o que causa uma subestimativa nas determinações de misturas muito ricas em flavonas.

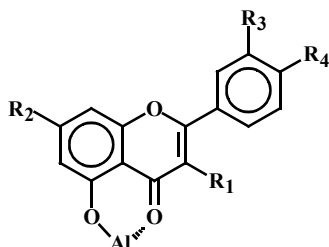


Figura 13. Complexo Flavonóide-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio.

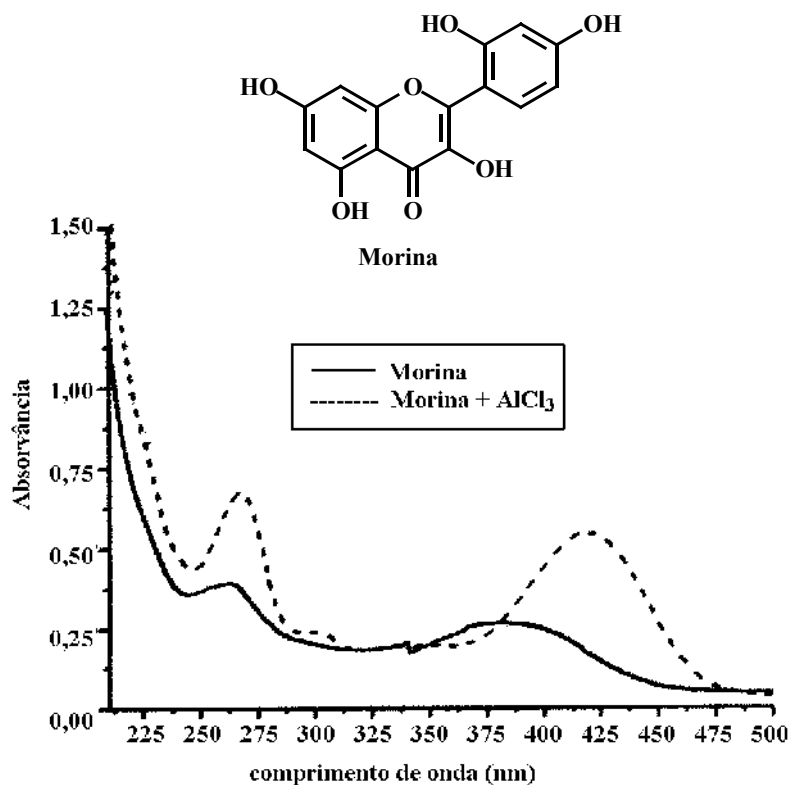


Figura 14. Espectros de absorção no UV (200-500 nm) para morina em metanol e morina com AlCl_3 (LIANDA & CASTRO, 2008, anexo 1, p. 156).

Tabela 2. Bandas de absorção de flavonóides em solução metanólica e na presença de cloreto de alumínio (AlCl_3).

Tipos de Flavonóides	Banda I (nm)	Banda II (nm)	Deslocamento provocado por complexação com AlCl_3 (nm)*
Flavonas	310-350	250-280	+ 35-55
Flavonóis	350-385	250-280	+ 35-55
Flavonóis (3-OH substituído)	330-360	250-280	+ 50-60
Isoflavonas	310-330 ombro	245-275	+ 10-14
Flavanonas e diidroflavonóis	300-330 ombro	230-270	+ 20-26

* Em 415 nm, os ácidos fenólicos e outras substâncias fenólicas não absorvem em presença de AlCl_3 , por isso não há interferência destas substâncias na quantificação de flavonóides.

Diversos trabalhos relacionam os totais de fenóis e/ou os totais de flavonóides com a atividade antioxidante de méis.

Beretta e colaboradores (2005) estudaram 14 méis de diferentes origens florais e geográficas da África, relacionando seus totais de fenóis, que variaram de 5,25 mg/100 g de mel a 78,96 mg/100 g de mel, com a atividade antioxidante, avaliada por diversos métodos.

Dentre outras atividades biológicas, Küçük e colaboradores (2007) estudaram a atividade antioxidante de um mel heterofloral (silvestre) e dois monoflorais (castanha e rododendro - *Ericaceae*) de Anatólia, na Turquia, considerando os conteúdos de fenóis totais. O conteúdo de fenóis totais foi maior para o mel castanha, seguido do heterofloral e por último o rododendro. Os resultados da atividade antioxidante respeitaram essa ordem (maior para mel castanha e menor para mel rododendro) em dois ensaios diferentes (seqüestro do radical superóxido e FRAP-ferric reducing/antioxidant power).

Em outro trabalho realizado com méis australianos de cinco espécies botânicas diferentes (*Melaleuca*, *Guioa*, *Lophostemon*, *Banksia* and *Helianthus*), o conteúdo de totais de fenóis variou de 2,13 mg/100 g de mel (*Helianthus annuus*) a 12,11 mg/100 g de mel (*Melaleuca quinquenervia*; YAOA *et al.*, 2005).

Fiorani e colaboradores (2006) avaliaram os teores de flavonóides totais de amostras de méis silvestres da região central da Itália, comparando os resultados dos extratos etéreos (valores variaram de 0,58 a 2,9 mg/100 g de mel) com extratos aquosos (valores variaram de 0,5 a 1,52 mg/100 g de mel), e os correlacionaram com a atividade antioxidante, além de outras atividades biológicas.

Na Espanha, cinquenta e três amostras de méis, sendo trinta e nove monoflorais, nove silvestres e cinco méis de melato, apresentaram seus conteúdos de totais de fenóis de 0,66, 0,87 e 1,03 mg/100 g de mel; respectivamente. O estudo da capacidade seqüestradora de radicais DPPH para esses méis, mostrou-se crescente nessa mesma ordem (PÉREZ *et al.*, 2007).

Já haviam sido estudados cinco méis do Yêmen [*Acacia ehrenbergina* (Salam-Tehamah), *Acacia edgeworhi* (Somar-Hadramout), *Ziziphus Spina-christi* L. (Sidr-Hadramout), *Ziziphus Spina-christi* L. (Sidr-Taiz), florada tropical (*Marbai-Hadramout*)], e quatro de outras regiões [um de florada tropical americana (Nova Orleans), um *Citrus* americano (Flórida), um de florada suíça e um de florada tropical iranianos] quanto aos teores de fenóis totais (pelo método de Folin-Ciocalteu) relacionando-os com a atividade antioxidante. O mel *Acacia ehrenbergina* (Salam-Tehamah) apresentou o maior conteúdo de fenóis totais e a maior atividade antioxidante, indicando, assim, seu potencial terapêutico (AL-MAMARY *et al.*, 2002). Em trabalho realizado por De Andrade e colaboradores (2007), os extratos das flores de *Acacia podalyriifolia*, coletadas em Curitiba-PR, Brasil, extraídas em diferentes solventes (hexano, diclorometano e acetato de etila) foram avaliados quanto ao conteúdo de compostos fenólicos (método de Folin-Ciocalteu) e suas atividades seqüestradoras do radical DPPH. O teor de fenóis totais foi mais elevado para a fração de acetato de etila, que demonstrou ter também, maior capacidade captadora de radical e conseqüentemente, a maior ação antioxidante.

4 –METODOLOGIAS USADAS PARA TIPIFICAÇÃO DO MEL

4.1 - Melissopalínologia

Sabe-se que as abelhas visitam apenas uma pequena parte da flora. A colheita do pólen pelos insetos em geral, não está condicionada pela quantidade de pólen produzido, mas pelas características dos seus constituintes.

As razões pelas quais as abelhas se orientam para as colheitas polínicas não são ainda completamente conhecidas, embora, LINDSTED (1971) tenha apresentado um trabalho sobre compostos que as atraem e orientam, assim como, compostos que as “prendem” declinando a procurarem outro tipo de alimento.

Alguns autores verificaram que substâncias, como os flavonóides e as antocianinas, existem nas flores para servir de “guias”, atraindo os insetos polinizadores até as fontes de néctar e/ou pólen. Os pigmentos amarelos mais comuns são os carotenóides, e os flavonóides (chalconas, auronas, 6- e 8-hidroxiflavonóis), que são muito importantes na coloração em um significativo número de plantas com flores amarelas (HARBONE & GREYER, 1993).

Segundo PERIS (1984) o “pólen apícola” é o resultado da aglutinação do pólen das flores com néctar e substâncias salivares das abelhas *Apis mellifera* que acumulam em cargas polínicas (semelhantes a pequenas pelotas) nas corbículas de suas pernas posteriores. O apicultor utiliza trampas de pólen que permitem despregar as pelotas de pólen das pernas das abelhas campeiras que retornam do campo. O pólen apícola comercializado é comumente processado, sofrendo classificação, limpeza, secagem e empacotamento.

As abelhas coletam o néctar e pólen das flores, que são utilizados como alimentos na colméia. A cavidade bucal está adaptada à sucção do néctar e as pernas especializadas para o recolhimento de grãos de pólen, que são compactados em cargas polínicas transportáveis. Ao coletarem o néctar das flores hermafroditas, grãos de pólen são adicionados ao néctar, que uma vez transformado em mel mantém a presença destes grãos, que é forte indicativo da origem botânica. Além da informação botânica, o espectro polínico de mel é também determinado pelas condições climáticas, fitogeográficas, agrônômicas e florestais da região nas quais esses produtos foram coletados (BARTH, 1989; DUTRA & BARTH, 1997).

O estudo da morfologia do grão de pólen é conhecido como Palinologia e o estudo da caracterização polínica no mel como Melissopalínologia (PERSANO ODDO & RICCIARDELLI D'ALBORE, 1989; BARTH, 1989; BARTH & DUTRA, 2000; TERRAB *et al.*, 2003). Grãos de pólen de diferentes plantas podem ser distinguidos sob um microscópio por seu tamanho e forma, e por seus padrões de superfície de sulco, poros, espinhos etc. A análise polínica é uma técnica laboratorial que permite caracterizar a origem floral, ou não-floral, de amostras de mel. O pólen introduzido no mel pelas abelhas pode refletir a fonte nectarífera da área de forrageamento das abelhas, bem como o seu potencial apícola. Caso haja dominância de florada de determinada espécie apícola, o mel produzido possui qualidades organolépticas, aspecto e consistência constantes, repetidas ano após ano na ocasião dessa florada. Através do espectro polínico do sedimento de mel é

possível identificar a espécie botânica apícola da qual foi obtido o mel e a proporção de participação de cada uma das espécies botânicas visitadas pelas abelhas durante a coleta de néctar. Esta análise se afirma na identificação floral de méis a partir de classes de frequência dos tipos polínicos, sendo aceitas internacionalmente.

Difícilmente há a ocorrência de mel “puro”, originário de néctar proveniente de uma só espécie vegetal. A diversidade floral conduz a necessidade de uma melhor caracterização polínica das espécies vegetais da localidade da fonte de mel produzida. Este procedimento permite diferenciar taxonomicamente as espécies vegetais da área de forrageamento da abelha, revelar suas preferências florais e como este recurso varia no tempo e no espaço. Assim, recomenda-se utilizar a seguinte classificação, que considera a frequência do pólen do mel: dominante (PD), acessório (PA) e isolado (PI, sendo, ainda, isolado importante - PIi e isolado ocasional - PIo). Os méis que contêm mais de 45% do total de grãos de pólen de uma mesma espécie serão considerados como PD, e sob a denominação de PA são compreendidas as espécies cujos grãos ocorrem na quantidade de 16 a 45% do total de grãos de uma amostra de mel. (ZANDER, 1935 *apud* BARTH, 1989).

Deve-se particularizar o caso de pólen acessório, duas categorias de amostras de mel. Uma é aquela que, além de pólen acessório, apresenta também pólen dominante, sendo, portanto, constituída de só duas espécies em quantidades diferentes. O outro caso é o da amostra desprovida de pólen dominante, apresentando somente uma ou mais espécies de pólen acessório. A grande maioria das espécies dadas como apícolas (plantas que possibilitam grande volume de produção de néctar) no Brasil ocorre nas amostras em quantidade reduzida como pólen isolado (PI), não ultrapassando 15% do total de grãos de pólen. Quando presentes na quantidade de 3 a 15% são chamados de pólen isolado importante (PIi), e até 3% de pólen isolado ocasional (PIo). Barth (1989) recomendou que para designar a planta apícola no rótulo de méis é necessário que este apresente no mínimo 45% de dominância e seja colhido, igualmente, de uma região com predominância floral na área de visitação das abelhas do apiário.

Apesar desse método ser tradicional para determinar a origem floral do mel, ele apresenta algumas limitações. Alguns grãos de pólen, tais como *Citrus* e membros da família *Lamiaceae* são sub-representados no espectro polínico do mel, enquanto outros (*Eucalyptus*, *Castanea* e *Myosotis*) são super-representados. Um mínimo de 10% de pólen *Citrus* sp. é suficiente para considerar o mel como unifloral,; e, é geralmente aceito que um conteúdo mínimo de 70% de pólen *Eucalyptus* é necessário para classificar um mel *Eucalyptus* como unifloral (OUCHEMOUKH *et al.*, 2007).

A abelha *Apis mellifera* explora basicamente os recursos primários para a sua alimentação, néctar e pólen, a partir de inúmeras espécies florais, mas esta dieta representa, normalmente, só cerca de 10% das espécies florais existentes na sua área de forrageamento. Embora este valor pareça baixo, é suficiente para que, na composição dos méis e dos pólenes apícolas, se verifique uma alta diversidade (BARTH, 1989).

Alguns méis podem ser identificados com mais ou menos certeza por seu aroma, cor, cristalização rápida, sabor ou por uma combinação dessas e de outras características. Alguns méis podem ser especificados porque são produzidos em colméias situadas dentro de grandes áreas com uma espécie de planta, durante o seu período de florescimento. Em áreas onde se praticam agricultura em grande escala e em formações geológicas de grande porte, com grandes áreas homogêneas de vegetação natural, pode existir pouca dúvida com

relação à fonte de mel obtido. Isto é especialmente válido se o apicultor for um bom observador de abelhas e das plantas ao alcance de coleta delas.

Alguns estudos de caracterização polínica foram feitos com 20 amostras de méis de laranjeira, procedentes dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo. Todas as amostras apresentaram o pólen de *Citrus* em porcentagem dominante ou acessória. Nas amostras provenientes do Rio de Janeiro foram encontrados como principais tipos polínicos acessórios, o pólen de *Eucalyptus* e *Anadenanthera*, e para São Paulo os de *Eucalyptus*, *Myrcia* e *Coffea* (BARTH & CORÉ-GUEDES, 1999).

Outro trabalho realizado no Brasil, na região de Bananal-SP, região que faz limite com o município de Barra Mansa-RJ, Dutra & Barth (1997) analisaram 22 amostras de méis, onde 15 eram de origem extrafloral, 4 eram heteroflorais, somente 2 uniflorais (*Eupatorium sp.* - erva de santa cruz e *Vernonia sp.* - assa-peixe) e um mel de melato. Este último apresentou na análise microscópica grande quantidade de massa granulosa, o que é característico desse tipo de mel (DUTRA & BARTH, 1997).

Alguns cuidados, porém, devem ser tomados com relação a adoção da melissopalínologia. No caso do mel de melato verifica-se que este contém relativamente poucos grãos de pólen (SAWYER, 1975), lembrando que este mel é produzido a partir da seiva de plantas e não do néctar das flores. Diferentes espécies de plantas produzem diferentes proporções de pólen, a quantidade de pólen pode variar de estação para estação, o néctar colhido pode ser diferente em flores machos e fêmeas, abelhas podem forragear o pólen sem coletar néctar. Outra limitação para este método é que o pólen pode ser adicionado fraudulentamente. E, ainda, no caso de mel *Citrus*, a análise de pólen não é útil como em algumas outras origens florais, devido ao fato de que a quantidade de pólen é geralmente pequena e muito variável (ANKLAM, 1998; FERRERES *et al.*, 1994). A origem botânica do mel, a qual influencia enormemente a preferência do consumidor, permanece ainda, difícil de ser determinada. Em alguns casos, contudo, a análise de pólen não é possível, como nos casos de méis de plantas estéreis.

Portanto, há discussão em torno da insuficiência da Melissopalínologia em apresentar as fontes de néctar corretamente: há floradas que apresentam pouco ou, quase nada de pólen, como ocorre com o mel de melato, que não contém pólen. Outros tipos de pólen presentes podem estar indicando a presença de outros tipos de néctar, tal como ocorre quando há méis antigos misturados com méis em uma mesma colméia, ou durante a centrifugação do mel. Há ainda possibilidade das abelhas ao colherem néctar de uma espécie floral contaminarem com pólen de outra, ao se desprender da corbícula acidentalmente, ou ainda abelhas que podem colher néctar de uma flor sem desprender pólen das anteras. E ainda, a fonte de pólen ser um recurso trófico exclusivo, sem permitir a coleta de néctar.

Para aumentar as chances de acerto, a amostragem deve ser cautelosa:

– O mel deve ser originário de quadro com lâmina de cera nova, coletado maduro (fechado), de preferência retirado da célula com seringa, ou prensado, ou centrifugado exclusivamente com outros favos de cera alveolada do período. A safra deste mel deve representar a coleta de mel de pelos menos 50% das colméias em produção. O mel deve ser armazenado em quantidades de 40 g por amostra, envasado em pote de plástico ou de vidro, com os registros: nome popular da flora dominante durante a colheita, local, data da coleta,

etc. Os potes devem ser higienizados para a colocação da amostra. Se possível, o pesquisador deve obter o pólen apícola do período da safra de colheita e informação do apicultor a respeito da espécie floral em maior densidade dez dias antes da colheita do mel maduro.

Outros aspectos limitantes envolvem o emprego da Melissopalínologia para a identificação da flora visitada pela abelhas, apesar de trazer grandes benefícios à apicultura e ao estudo da biologia das abelhas. Um destes aspectos é de ordem metodológica. Por exemplo, antes que métodos quantitativos possam ser empregados na análise de méis de uma determinada região, é necessário que se estude a quantidade de resíduo polínico presente, normalmente, em méis extraídos de formas diferentes e originados de plantas distintas na região. Um outro é de ordem econômica, onde o emprego de equipamento relativamente caro e de pessoal especializado faz com que as técnicas palinológicas não estejam ao alcance da maioria dos produtores individuais. Entretanto, todas estas limitações poderiam ser suplantadas, caso as cooperativas apícolas mantivessem laboratórios especializados ou convênios com instituições de pesquisa, como as universidades ou as empresas estaduais e federais de pesquisa agropecuária, o que ainda não acontece.

A qualidade do mel é julgada pela sua origem botânica e pela sua composição química e o seu preço está baseado na sua qualidade e, sendo assim, na sua origem floral (DATTA *et al.*, 2003). Tradicionalmente, a fonte floral de um mel tem sido identificada pela análise do pólen apícola presente. Contudo, Tan *et al.* (1989) sugeriram que uma abordagem química deveria ser mais precisa e de mais fácil entendimento na caracterização da origem floral do mel.

Nos últimos anos tem havido um interesse crescente em se desenvolver métodos analíticos que possam vir a complementar a análise do pólen, auxiliando na determinação da origem floral do mel. Abordagens químicas têm sido sugeridas, onde a identificação de substâncias características do néctar de certos tipos de plantas, as quais podem ou não ser modificadas bioquimicamente pelas enzimas das abelhas, para que possam auxiliar na caracterização da fonte floral do mel (D'ARCY *et al.*, 1997; TAN *et al.*, 1989). Em particular, a combinação de métodos físicos e químicos poderia ser uma abordagem promissora para demonstrar autenticidade dos diferentes méis (ANKLAM, 1998). As análises das substâncias fenólicas, incluindo os flavonóides, têm sido sugeridas na identificação de mel (AMIOT *et al.*, 1989), e dessa forma tem sido usado como ferramenta para o estudo da origem botânica e geográfica.

4.2 – Análises Cromatográficas de Substâncias Fenólicas em Méis

O isolamento e caracterização de metabólitos especiais requerem cada vez mais a utilização de técnicas cromatográficas modernas, que possam aumentar de forma considerável a sensibilidade e a seletividade da análise dos compostos de interesse. Atualmente, existe a possibilidade de se realizar esquemas rápidos e adequados de separação e caracterização, por meio de uma escolha acertada das diferentes técnicas cromatográficas disponíveis (HOSTETTMANN *et al.*, 2003).

Nos últimos anos a cromatografia líquida, principalmente CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) com o uso de coluna de fase reversa, tem sido aplicada para

identificação de flavonóides e ácidos fenólicos em alimentos, extratos de plantas e produtos apícolas (MERKEN & GARY, 2000; YAOA *et al.*, 2005; FIORANI *et al.*, 2006; GÓMEZ-CARAVACA *et al.*, 2006; DIMITROVA *et al.*, 2007; KENJERIC *et al.*, 2008; KAHOUN *et al.*, 2008). Em geral, o isolamento desses compostos fenólicos pode ser feito por cromatografia em coluna aberta usando como adsorventes resinas Amberlite XAD-2, XAD-8 e DEAE celulose (dietilaminoetilcelulose) (MAGGI *et al.*, 1989; YAOA *et al.*, 2005; FIORANI *et al.*, 2006; GÓMEZ-CARAVACA *et al.*, 2006; KENJERIC *et al.*, 2008; ESTEVINHO *et al.*, 2008; RASMUSSEN *et al.*, 2008). As forças adsorptivas envolvidas no uso dessas resinas são, principalmente, interações de van der Waals, e os compostos analisados contendo fenólicos e/ou grupos carboxílicos são influenciados pelo pH.

Segundo os dados da literatura, separação e identificação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência tem sido apontada como uma técnica muito promissora para estudar a origem floral e geográfica de méis (BANKOVA *et al.*, 1982; AMIOT *et al.*, 1989; FERRERES *et al.*, 1992; SABATIER *et al.*, 1992; TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 1993; ANDRADE *et al.*, 1997), bem como, um bom método de separação e determinação de polifenóis em vegetais, frutas e chás usando como detector o arranjo de fotodiodos (SAKAKIBARA *et al.*, 2003; MERKEN & GARY, 2000).

Um interesse crescente em se desenvolver métodos analíticos que possam vir a complementar a análise do pólen na determinação da origem floral do mel tem surgido na literatura. Nos últimos anos, pesquisas apresentaram a análise de aminoácidos (BOSI & BATTAGLINI, 1978), compostos voláteis (BONAGA & GIUMANINI, 1986; D'ARCY *et al.*, 1997), compostos fenólicos (AMIOT *et al.*, 1989), ácidos aromáticos e seus ésteres (STEEG & MONTAG, 1988) e derivados de carotenóides (TAN *et al.*, 1989), utilizando cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas, para o assinalamento da origem floral de méis europeus.

Segundo os dados da literatura, a CLAE tem sido apontada nos últimos anos como a técnica de escolha para analisar grande parte dos componentes não-voláteis que constituem os méis europeus, e que auxiliam na caracterização da origem floral e geográfica (AMIOT *et al.*, 1989; FERRERES *et al.*, 1992; SABATIER *et al.*, 1992; TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 1993; MARTOS *et al.*, 2000). Esses estudos relatam a ocorrência de padrões de flavonóides (flavonas e flavonóis) e de derivados de ácidos benzóico e cinâmico como sendo importantes marcadores químicos de méis de diferentes regiões e origens geográficas (ESTEVINHO *et al.*, 2008).

Análise de compostos fenólicos por CLAE tem sido sugerida como uma técnica promissora para o estudo da origem floral e geográfica do mel (AMIOT *et al.*, 1989; FERRERES *et al.*, 1992; SABATIER *et al.*, 1992; TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 1993). Em dez amostras de méis espanhóis foram avaliados dezesseis flavonóides agliconas por CLAE em fase reversa, com o intuito de investigar a origem geográfica. Os principais flavonóides identificados foram pinocembrina, pinobanksina, galangina, crisina, luteolina, apigenina, isorhamnetina e 3-metil quercetina. Muitos desses flavonóides foram encontrados também em própolis (FERRERES *et al.*, 1991).

A flavanona hesperetina foi usada como marcador para caracterizar mel *Citrus* europeu não tendo sido detectada em nenhum outro tipo de mel estudado anteriormente, incluindo rosmaninho, lavanda, girassol, amêndoa, castanha, trevo branco, eucalipto, *Erisarum*, *Robinia*, *Rhododendron*, *Tília*, *Prosopis*, *Calluna* e méis multiflorais

(FERRERES *et al.*, 1993; 1994). Enquanto, o flavonol canferol foi descrito para mel rosmaninho (FERRERES *et al.*, 1994a; 1998) e a quercetina para mel de girassol (em níveis relativamente altos 125-290 mg/100g mel) (TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 2001). Além dessas substâncias, alguns ácidos fenólicos também foram encontrados e usados como marcadores químicos. Destacam-se os ácidos cafeico, *para*-cumárico e ferúlico em méis de castanha (ANDRADE *et al.*, 1997; FERRERES *et al.*, 1996a). Pinocembrina, pinobanksina e crisina são flavonóides característicos da própolis, e estas substâncias foram encontradas na maioria dos méis europeus (TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 2001).

Em algumas amostras de méis, tais como lavanda e acácia, nenhum composto fenólico específico foi útil como marcador químico (TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 2001). Porém outros possíveis marcadores fitoquímicos, tal como o ácido abscísico foi indicado como possível marcador para o mel urze (“heather”) por Ferreres e colaboradores (1996), e posteriormente, foi encontrado em quantidades significantes em méis de acácia (TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 2001).

Sabatier e colaboradores (1992) descreveram em seu trabalho, a identificação de pinocembrina, pinobanksina, crisina, galangina, quercetina, canferol e tectocrisina em mel de girassol francês, utilizando CLAE com detector de arranjo de fotodiodos, com o apoio de outras técnicas, a cromatografia de camada fina e cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas. Entre os flavonóides descritos, duas principais estruturas foram encontradas: as flavanonas e os flavanóis.

Martos *et al.* (2000) descreveram a identificação dos flavonóides: miricetina, tricetina, quercetina, luteolina e canferol em diversos méis europeus de eucalipto por CLAE, com o propósito de correlacioná-los com a origem floral e/ou geográfica. Sendo que a miricetina, tricetina e luteolina não haviam sido associadas, até então, com qualquer origem floral específica, podendo então ser marcadores do mel eucalipto.

Em 1997, Andrade *et al.* compararam dois tipos de méis portugueses, o mel urze *Erica* sp e lavanda (*Lavandula stoechas*), e observaram que as amostras continham um perfil de ácidos fenólicos comum, incluindo os ácidos vanílico, clorogênico, cafeico, *para*-cumárico, ferúlico, *meta*-cumárico e cinâmico. O ácido gálico apareceu somente no mel lavanda. O mel urze foi caracterizado pela presença dos ácidos *para*-hidroxibenzóico, siríngico, *orto*-cumárico e elágico. A presença do ácido elágico em méis *Erica* spp estava de acordo com relatos anteriores, que o sugerem como marcador de origem floral. Considerando a grande quantidade de ácido *para*-cumárico nas amostras de mel urze (cerca de 39%) e pequena quantidade presente no mel lavanda, também poderia ser relacionado com a origem floral do mel *Erica* spp. Em outro trabalho com méis de urze foram identificados os flavonóides miricetina, 3-metil miricetina, 3'-metil-miricetina e tricetina (GUYOT *et al.*, 1999).

Amostras de méis da Tunísia (norte da África), bem como própolis da mesma região, foram estudadas com o intuito de compará-las com o perfil europeu, além do interesse nessas substâncias para determinação de origem geográfica e floral do mel. Os perfis dos compostos fenólicos investigados nessas amostras foram completamente diferentes daqueles encontrados nos méis europeus oriundos de diferentes origens florais. Os méis europeus apresentaram o perfil para compostos fenólicos, relativamente constante, porém os méis tunisianos mostraram uma variação, mesmo quando originários de mesma fonte floral. Apenas cinco das treze amostras demonstraram conter flavonóides derivados

de álamo (a principal planta fornecedora de própolis na Europa): pinocembrina, crisina, galangina e pinobanksina, exatamente os que apresentaram maior conteúdo total de fenólicos. Ainda procurando relacionar as substâncias fenólicas dos méis da Tunísia com os marcadores químicos dos méis europeus, o mel rosmaninho da Tunísia também apresentou como principais constituintes o canferol e 8-metoxicanferol. O mel de *Citrus* da Tunísia, também apresentou hesperetina, em quantidades similares às encontradas nos méis de *Citrus* da Espanha (MARTOS *et al.*, 1997).

Com o intuito de analisar o conteúdo de flavonóides presente em méis de eucaliptos da Austrália, e determinar se os marcadores encontrados em méis eucaliptos europeus estavam também presentes nas amostras australianas, Martos *et al.* (2000) e Yao *et al.* (2004) analisaram sete amostras de *Eucalyptus pilligaensis*, duas amostras de *E. melliodora* e seis amostras de *E. camaldulensis* utilizando cromatografia líquida. Os cromatogramas das três espécies australianas e da espécie européia demonstraram perfis similares para a presença de miricetina, tricetina, quercetina, luteolina e canferol (este minoritário). Porém, os flavonóides pinocembrina, pinobanksina e crisina encontrados no mel europeu, não estiveram presentes no mel australiano; que por sua vez, apresentou a 3-metilquercetina que não havia sido relatada no mel eucalipto europeu.

Em outro trabalho, realizado por Yao *et al.* (2004a), foram os ácidos fenólicos investigados como marcadores químicos de méis de eucalipto australiano (*E. intermedia*, *E. ochrophloia*, *E. crebra*, *E. nubila*, *E. melliodora*, *E. moluccana*, *E. camaldulensis*, *E. globoidia*, *E. largiflorens*). O ácido gálico foi o de maior concentração encontrado em todos os tipos de méis estudados, exceto para o mel de *E. globoidia*, que foi dominado pelo ácido elágico. Como o ácido gálico não havia sido até então relatado, ele foi indicado como marcador floral para méis eucaliptos australianos.

Segundo relatos de Anklam (1998), o mel de trigo mourisco apresentou alto conteúdo de ácido *para*-hidroxibenzóico. A análise do extrato identificou ainda, os seguintes compostos: ácidos 3,4-diidroxibenzóico, *para*-hidroxifenilático, 2,5-diidroxibenzóico, *para*-hidroxifenilacético, *meta*-hidroxibenzóico, 3,4-diidroxicinâmico, *para*-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico, *orto*-hidroxibenzóico, *para*-cumárico e 4-hidroxi-3-metoxicinâmico.

Na Croácia em duas regiões de produção de mel de sálvia (*Salvia officinalis* L.) foram avaliados trinta e oito amostras por CLAE-DAD. Nesse trabalho foram identificados os flavonóides quercetina, luteolina, canferol, apigenina, crisina e galangina, bem como os ácidos *para*-cumárico e cafeico. O ácido abscísico foi identificado como majoritário, podendo talvez diferenciar esses méis de outros. Os conteúdos de flavonóides totais variaram de 109,9 à 589,9 mg/100 g de mel (KENJERIC *et al.*, 2008).

Com o objetivo de identificar os flavonóides e correlacioná-los com a atividade antioxidante, Munôz *et al.* (2007) estudaram vinte e seis méis produzidos em diversas regiões do Chile. Os principais flavonóides identificados foram pinocembrina, pinobanksina, quercetina, canferol, crisina e galangina, além dos éteres: 3-metil-canferol, luteolina, 7-metil-luteolina, 3-metil-quercetina e isorramnetina; todos eles característicos também de própolis. Os resultados desse estudo sugeriram altos níveis de conteúdo de fenólicos e flavonóides nos méis chilenos.

Em méis brasileiros, De Maria *et al.*, 1999, estudaram os principais constituintes não-voláteis de amostras de mel genuíno derivados de diferentes espécies de plantas

encontradas em distintos estados brasileiros. Os níveis de água, acidez total, prolina livre, atividade de diastase, HMF, frutose e glicose foram determinados em setenta e quatro diferentes tipos de méis de *Apis mellifera* de quatro regiões do Brasil, porém nenhum composto fenólico foi investigado e relacionado à origem botânica.

O nosso grupo de pesquisa (DA SILVA; LIANDA; MONTAGNI) vem estudando os perfis cromatográficos de polifenóis em amostras de méis e pólen brasileiros de *Apis mellifera*. Até o presente momento foram realizadas análises dos méis de eucalipto e silvestres dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, sendo que o trabalho foi desenvolvido na dissertação de mestrado de Da Silva (2004, Tabela 3) e méis de laranjeira e silvestre do Rio de Janeiro e São Paulo, realizado na dissertação de Lianda (2004, Tabela 4). Com a finalidade de dar continuidade à investigação de marcadores químicos para os diferentes méis brasileiros, e entender também a composição química do pólen apícola, na dissertação de Montagni (2005, Tabelas 5 e 6) foram investigados os ácidos fenólicos e flavonóides em amostras de mel e pólen silvestre e de assa-peixe, e de mel de macieira, de diferentes regiões brasileiras.

Tabela 3. Substâncias fenólicas identificadas nos méis de eucalipto e silvestres (DA SILVA, 2004 - UFRRJ).

Amostras de méis	Substâncias Fenólicas identificadas por CLAE-DAD
Méis Eucalipto (RJ e SP)	Ácidos: gálico, vanílico, <i>para</i> -cumárico, ferúlico e cinâmico.
Méis Silvestre (RJ)	Ácidos: gálico, vanílico, clorogênico, <i>orto</i> -cumárico, cinâmico e <i>orto</i> -metoxi-cinâmico.

Tabela 4. Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestres e de laranjeira (LIANDA, 2004 - UFRRJ).

Amostras de méis	Substâncias Fenólicas identificadas por CLAE-DAD
Méis Silvestre (RJ e SP)	Ácidos: <i>para</i>-metoxi-benzóico, <i>para</i>-metoxicinâmico, <i>para</i>-hidroxi-benzóico, gálico, vanílico, sinápico, protocatecuico, <i>para</i>-cumárico Flavonóides: morina, quercetina
Méis Laranjeira (RJ e SP)	Ácidos: <i>para</i>-hidroxi-benzóico, vanílico, <i>para</i>-cumárico, gálico, sinápico, siringico, protocatecuico, <i>para</i>-cumárico, cinâmico e <i>para</i>-metoxi-cinâmico. Flavonóides: morina, quercetina, rutina

Tabela 5. Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestres, de assa-peixe e de macieira (MONTAGNI, 2005 - UFRRJ).

Amostras de méis	Substâncias Fenólicas identificadas por CLAE
Méis Silvestre (regiões PR,MT,PB)	Ácidos: gálico, protocatecuico, vanílico, clorogênico, <i>meta</i> -cumárico, <i>para</i> -cumárico cinâmico, <i>para</i> -metoxi-benzóico, <i>para</i> -metoxicinâmico, <i>para</i> -hidroxi-benzóico, Flavonóides: quercetina, hesperidina, rutina
Méis Assa-peixe (MG, SP, PR)	Ácidos: gálico, protocatecuico, vanílico, <i>meta</i> -cumárico, cinâmico, <i>para</i> -metoxi-benzóico, <i>para</i> -metoxicinâmico, <i>para</i> -hidroxi-benzóico, Flavonóides: quercetina, rutina
Mel Macieira (SP)	Ácidos: <i>para</i> -hidroxi-benzóico, <i>para</i> -cumárico, <i>para</i> -metoxi-benzóico. Flavonóide: quercetina

Tabela 6. Substâncias fenólicas identificadas nas amostras de pólen apícolas (MONTAGNI, 2005 - UFRRJ).

Amostras de Pólen	Flavonóides Identificados
Silvestre -MT	trictina, miricetina
Silvestre-PR	trictina, miricetina
Assa-peixe-SP	Miricetina

No trabalho desenvolvido por Lianda (2004) foi descrito, pela primeira vez, a presença de flavonóides em méis brasileiros. Os méis de laranja, (duas amostras de Botucatu-SP e uma amostra de Taubaté-SP) apresentaram além dos ácidos fenólicos, os flavonóides morina e quercetina, e um outro mel de Botucatu-SP apresentou quercetina e rutina. Para as amostras de méis silvestres, uma de Itararé-SP apresentou morina e quercetina, enquanto outra de Paraty-RJ apresentou apenas a morina. A morina foi isolada de uma das amostras de mel (Taubaté-SP) e esta substância não havia sido citada até então em outro mel, segundo relatos da literatura (LIANDA & CASTRO, 2008). Uma possível razão para se justificar a presença da morina em mel *Citrus* sp., coletado na região de Mata Atlântica, pode ser em virtude da existência de várias espécies nativas e abundantes na região de coleta do mel; como no caso a presença de *Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudich, que já foi estudada e revelou a presença da morina em sua composição química (WU *et al.*, 1994). Os perfis cromatográficos das substâncias fenólicas para os méis monoflorais (laranja), oriundos de diferentes regiões geográficas, não sofreram alterações qualitativas

drásticas, quando comparados aos méis heteroflorais (silvestres), que apresentaram um perfil para os compostos fenólicos bastante variado. A ocorrência dos ácidos protocatecuico e *para*-cumárico em quatro amostras de méis de laranjeira indicou que estas substâncias poderiam ser usadas como marcadores químicos destas espécies. Para os méis heteroflorais (silvestre) não foi observada a presença constante de nenhum dos ácidos estudados, de forma que pudessem ser considerados possíveis marcadores. Talvez isso possa estar relacionado à diversidade da origem geográfica e botânica. Sendo assim, será necessário um estudo mais aprofundado para a confirmação inequívoca da composição química deste mel, utilizando um número maior de amostras (LIANDA, 2004).

Em todos esses estudos, as análises dos ácidos fenólicos e flavonóides foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência, através da observação do perfil cromatográfico dessas substâncias com o uso de padrões. Os compostos fenólicos foram identificados e quantificados através da comparação dos seus tempos de retenção com os padrões autênticos, além da comparação de seus espectros de ultravioleta e, em alguns casos, o uso da espectrometria de massa (MARTOS *et al.*, 1997; 2000; 2000a; MERKEN & GARY, 2000; DATTA *et al.*, 2003, YAO *et al.*, 2004; LIANDA, 2004; YAOA *et al.*, 2005; GÓMEZ-CARAVACA *et al.*, 2006; DIMITROVA *et al.*, 2007; KENJERIC *et al.*, 2008). Nesses trabalhos o perfil dos compostos fenólicos foi característico dos tipos florais estudados e, assim, as substâncias analisadas serviram como marcadores bioquímicos para autenticação botânica dos méis. O resultado mostrou que a análise por CLAE das substâncias não-voláteis pode servir como ferramenta coadjuvante para a determinação floral dos méis. O uso de detector de arranjo de fotodiodos (DAD) foi muito útil para a identificação das substâncias presentes no mel (TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 1993).

A procura por produtos naturais, sem contaminação, coloca o Brasil em situação privilegiada de fornecimento de produtos apícolas no mercado nacional e internacional, tendo por base a biodiversidade da nossa flora, a rusticidade e resistência das nossas abelhas e a diversidade de nosso clima. Desta forma, é importante o aperfeiçoamento da apicultura, em relação à produção e manipulação do mel e derivados, bem como, o conhecimento dos constituintes químicos que asseguram a tipificação destes produtos.

Nesse trabalho foram estudados os méis dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo (mais pobre em flora), onde são encontrados, com facilidade, três tipos de méis, principalmente o de flores silvestres, devido à vasta diversidade de espécies botânicas; os méis de flores de eucalipto (*Eucalyptus* spp), provenientes das grandes áreas de reflorestamento; e os méis de flores de laranjeira (*Citrus* spp), que possuem maior procura, devido às suas características próprias obtidas a partir do néctar cítrico (KOMATSU *et al.*, 2002).

5 – OBJETIVOS

5.1 - Objetivos Gerais

O objetivo do presente trabalho é dar continuidade (foi iniciado durante o mestrado, LIANDA, 2004) ao estudo sistemático de méis brasileiros de *Apis mellifera*, com base nas análises dos perfis cromatográficos das substâncias fenólicas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplado ao detector de arranjo de fotodiodos (DAD), e correlacioná-los aos possíveis marcadores bioorgânicos para determinação da origem floral e/ou geográfica do mel.

5.2 - Objetivos Específicos

- Analisar o perfil cromatográfico das substâncias fenólicas nos méis uniflorais de laranjeira e eucalipto por cromatografia líquida de alta eficiência, buscando identificar marcadores bioorgânicos para a origem botânica e/ou geográfica.
- Analisar o perfil cromatográfico das substâncias fenólicas dos méis silvestres oriundos da Mata Atlântica (segundo informações do apicultor), buscando identificar marcador químico de origem geográfica.
- Determinar os teores de fenóis totais e de flavonóides totais das amostras de méis, através de técnicas colorimétricas, com o uso do ultravioleta.
- Avaliar o potencial antioxidante dos méis e dos seus extratos fenólicos utilizando o método de captura dos radicais livres (DPPH).
- Correlacionar o perfil cromatográfico dos extratos fenólicos com os resultados obtidos para os ensaios de totais de fenóis e de flavonóides, com as atividades antioxidantes dos méis e seus extratos fenólicos.
- Identificar e quantificar os grãos de pólen no mel, para identificar as fontes florais em cada região florístico-geográfica.

6 – PARTE EXPERIMENTAL

6.1 – Material e Métodos

Todos os solventes com graus de pureza para análise e espectroscópicos foram obtidos comercialmente da Vetec Química Fina Ltda e da Tedia, e foram utilizados sem purificação prévia. A água utilizada na cromatografia líquida e nas purificações das amostras de méis foi purificada em um aparelho de Milli-Q da Millipore. O ácido acético glacial, grau espectroscópico, foi obtido da Tédia Brasil e usado como modificador de pH da fase aquosa nas análises por cromatografia líquida de alta eficiência.

As análises utilizando cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foram realizadas em cromatofolhas de alumínio com gel de sílica 60 F254 (Merck, Darmstadt, Germany). Foram selecionados, após diversas investigações, dois eluentes, um para ácidos fenólicos e flavonóides livres (hexano: acetato de etila: ácido fórmico – 15: 24: 1) e outro para flavonóides glicosilados (clorofórmio: metanol: água: ácido fórmico – 30: 18: 1: 1). A visualização das substâncias em camada fina foi feita, quando possível, sob luz UV a 254 e 365 nm e/ou pulverizadas com solução 1% de AlCl_3 em etanol como revelador químico para a avaliação de flavonóides. As misturas dos solventes utilizados nos processos cromatográficos foram feitas em % v/v.

As frações contendo as substâncias fenólicas foram separadas por cromatografia em coluna aberta (CC) usando resina Amberlite XAD-2 (copolímero de estireno e divinilbenzeno, com poro 9 nm e partícula 0,3–1,2 mm), obtido comercialmente da Supelco (Bellefonte, PA, EUA).

Os solventes e as amostras foram previamente filtradas em membranas de nylon de 0,45 μm obtidas da Sartorius antes de serem analisadas por CLAE.

A eliminação dos solventes dos extratos e das frações obtidas das colunas cromatográficas foi feita sob pressão reduzida em evaporadores rotatórios FISATON, mantendo a temperatura do banho de água a 40°C.

Os ensaios de totais de fenóis e de flavonóides dos méis, cujas leituras espectrofotométricas foram realizadas na região UV, foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV mini 1240, utilizando como solvente metanol grau espectroscópico e água Milli-Q.

As leituras espectrofotométricas na região UV realizadas, tanto para os padrões quanto para as amostras, na avaliação da atividade antioxidante foram obtidas no aparelho ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay), modelo 680 microplate reader da Bio Rad, utilizando como solvente metanol grau espectroscópico e/ou água de Milli-Q.

O estudo dos grãos de pólen no mel (Melissopalínologia), bem como a discussão dos resultados obtidos, foram realizados no Laboratório ABELHA-NATUREZA, do Instituto de Zootecnia da UFRRJ.

6.2 - Amostras de Méis

As amostras de méis foram compradas diretamente de apicultores ou entrepostos de distribuição de produtos apícolas ou do comércio local. Os méis estudados foram oriundos das seguintes regiões: Paraty, no estado do Rio de Janeiro; Itararé, Botucatu, Juquitiba, Bebedouro, Aguai, Águas da Prata, no estado de São Paulo; Uberaba e Guaxupé, no estado de Minas Gerais. As amostras compradas no comércio foram das seguintes regiões: Rio de Janeiro e Niterói, no estado do Rio de Janeiro; Botucatu e Itapira, no estado de São Paulo; e Campestre, no estado de Minas Gerais. Uma amostra de mel foi adquirida em um entreposto de distribuição em Campinas-SP, sendo sua origem geográfica não identificada (Tabela 7). Algumas amostras de méis estudadas anteriormente (LIANDA, 2004) foram selecionadas para o estudo da atividade antioxidante (Tabela 8).

Para a determinação dos perfis cromatográficos foram estudadas vinte e quatro amostras de méis de diferentes regiões que tiveram suas predominâncias florais declaradas pelos produtores, conforme segue: cinco amostras de méis silvestre (heterofloral), dezesseis amostras de méis de laranjeira (monoflorais) e três amostras de méis de eucalipto (monoflorais) comercializadas no período de 2003 a 2008 (Tabelas 7 e 8). Todas as amostras foram guardadas na geladeira a 4°C até o momento da análise, a fim de evitar qualquer tipo de alteração.

Tabela 7. Amostras de méis analisadas nesse trabalho.

Código da Amostra	Tipo de mel	Origem Floral	Data de Coleta	Data de Chegada	Origem Geográfica
^{a,b,c} RLS21-acet	silvestre	Heterofloral	01/2004	11/2004	Itararé-SP
^{a,b,c} RLS23-éter	silvestre	Heterofloral	03/2004	12/2004	Juquitiba-SP
^{a,c} RLS24-acet	silvestre	Heterofloral	01/2005	03/2005	Juquitiba-SP
^d RLL22	laranjeira	<i>Citrus</i>	01/2004	11/2004	Itararé-SP
^d RLL25	laranjeira	<i>Citrus</i>	*	03/2005	Rio de Janeiro-RJ (Comércio)
^d RLL26	laranjeira	<i>Citrus</i>	*	03/2005	Campestre-MG (Comércio)
^d RLL27	laranjeira	<i>Citrus</i>	*	09-10/2004	Bebedouro-SP
^a RLL28-acet	laranjeira	<i>Citrus</i>	*	01/2006	Campestre-MG (Comércio)
^a RLL29-acet	laranjeira	<i>Citrus</i>	*	05/2006	Itapira-SP (Comércio)
^a RLL30-éter	laranjeira	<i>Citrus</i>	*	01/2008	Aguaí-SP
^a RLL31--acet	laranjeira	<i>Citrus</i>	*	11/2005	Bebedouro-SP
^a RLL32-acet	laranjeira	<i>Citrus</i>	*	11/2006	Bebedouro-SP
^{a,c} RLL40-éter	laranjeira	<i>Citrus</i>	10/2006	10/2006	Paraty-RJ
^a RLL41-acet	laranjeira	<i>Citrus</i>	10/2007	01/2008	Aguaí-SP
^a RLE34-acet	eucalipto	<i>Eucalyptus</i>	*	08/2006	Uberaba-MG
^a RLE35-éter	eucalipto	<i>Eucalyptus</i>	*	04/2007	São Carlos-SP
^a RLE36-acet	eucalipto	<i>Eucalyptus</i>	*	*	Campinas-SP (entrepósito de distribuição)

* sem informação.

^a análises por CLAE-DAD.

^b avaliação de atividade antioxidante (DPPH), determinação de fenóis totais (Reagente de Folin-Denis) e de flavonóides totais (AlCl₃).

^c amostras oriundas de Mata Atlântica (segundo informações do apicultor).

^d amostras que foram descartadas durante o trabalho, por não apresentarem perfis cromatográficos coincidentes com os padrões avaliados ou perfis polínicos interessantes.

Tabela 8. Amostras de méis selecionadas para avaliação de atividade antioxidante e analisadas em trabalho anterior (LIANDA, 2004 - UFRRJ).

Código da Amostra	Tipo de mel	Origem Floral	Data de Coleta	Data de Chegada	Origem Geográfica
^{a,b,c} RLS10-éter	silvestre	Heterofloral	03/2004	03/2004	Paraty-RJ
^{a,b,c} RLS12-éter	silvestre	Heterofloral	12/2003	03/2004	Itararé-SP
^{a,b} RLL03-éter	laranjeira	CITRUS	*	06/2003	Niterói-RJ (Comércio)
^{a,b,c} RLL15-acet	laranjeira	<i>Citrus</i>	*	03/2004	Botucatu-SP
^{a,b,c} RLL16-acet	laranjeira	<i>Citrus</i>	*	03/2004	Botucatu-SP
^{a,b,c} RLL18-éter	laranjeira	<i>Citrus</i>	*	03/2004	Itararé-SP
^{a,b} RLL19-acet	laranjeira	<i>Citrus</i>	*	03/2004	Botucatu-SP (Comércio)

* sem informação.

^a análises por CLAE-DAD.

^b avaliação de atividade antioxidante (DPPH), determinação de fenóis totais (Reagente de Folin-Denis) e de flavonóides totais (AlCl₃).

^c amostras oriundas de Mata Atlântica (segundo informações do apicultor).

6.3 - Padrões Utilizados

Os padrões dos ácidos *trans*-cinâmico, cafeico, protocatecuico, *meta*-cumárico, *orto*-cumárico e *para*-cumárico foram obtidos comercialmente da Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO, EUA) e os ácidos gálico, siríngico, ferúlico, sinápico, *orto*-metoxi-cinâmico, *para*-metoxi-cinâmico, *para*-metoxi-benzóico, *para*-hidroxibenzóico, *meta*-hidroxibenzóico, vanílico e clorogênico da Merck (Darmstadt, Alemanha). Os flavonóides quercetina, morina, canferol, hesperidina, rutina, quercetrina, isoramnetina, isoquercetrina, miricetrina, luteolina, miricetina, naringenina, apigenina e canferol-3-glicosilado foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A tricetina foi doada gentilmente, pelo Prof^o Dr. Mário Geraldo de Carvalho (DEQUIM-UFRRJ). As soluções dos padrões foram preparadas individualmente ou misturadas. Essas soluções foram feitas a 1% em metanol (grau espectroscópico) e utilizadas como solução estoque padrão. Todas as soluções foram filtradas previamente antes da análise por CLAE, através de membrana de nylon de 0,45 µm.

Para avaliação de atividade antioxidante foi utilizado o padrão do DPPH (2,2-difenilpicril-hidrazil) obtido da Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemanha) também solubilizado em metanol.

6.4 - Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os padrões e as amostras dos méis foram analisados em um aparelho Shimadzu equipado com duas bombas modelo LC 10-AS, um detector de ultravioleta-visível com comprimento de onda variável (analisados a 365 nm), modelo SPD-10A, e integrador modelo CR-6A. As amostras foram solubilizadas em metanol e injetadas através de injetor Rheodyne 7125i com *loop* de 20 μ L. As análises dos ácidos fenólicos e flavonóides foram realizadas em coluna de fase reversa C-18 (250 mm x 4,6 mm d.i. e 5 μ m de tamanho de partícula, BETASIL) usando como fase móvel metanol: acetonitrila (90:10, solvente A) e água: ácido acético (99:1, solvente B). A separação foi feita com fluxo constante de 1,0 mL.min⁻¹ e gradiente de eluição: 75% do solvente B, inicialmente, este foi reduzido para 30% em 25 minutos, 20% do solvente B em 29 minutos, 5% do solvente B em 31 minutos, e, finalmente, com retorno para 75% do solvente B após 33 minutos.

O monitoramento dos cromatogramas foi realizado a 270 e 340 nm, visto que a maioria dos ácidos fenólicos e flavonóides encontrados nos méis mostram suas absorções máximas no ultravioleta, próximos a esses comprimentos de onda (MARTOS *et al.*, 1997).

Todas as análises foram realizadas novamente em outro aparelho (local – UNRC, Universidad Nacional de Rio Cuarto, Córdoba – Argentina) equipado com quatro bombas, Waters 2695, e um detector de arranjo de fotodiodos, Waters 2996, devido à presença desse detector. Com essa mudança de aparelho, fez-se necessário também a alteração de coluna e, portanto, alguns ajustes nas condições cromatográficas. As amostras foram solubilizadas em metanol: solvente B (fase móvel, 5:95) e injetadas através de injetor automático com *loop* de até 100 μ L, variando os volumes de injeção de 20-40 μ L. As análises foram realizadas em coluna de fase reversa C-18 (100 mm x 2 mm d.i. e 3 μ m de tamanho de partícula, PHENOMENEX GEMINI) usando como fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B). A separação foi feita com fluxo constante de 0,2 mL.min⁻¹ e gradiente de eluição: 96 % do solvente B inicialmente, este foi reduzido para 5 % em 30 minutos, com retorno para 96 % do solvente B após 32 minutos. O monitoramento dos cromatogramas foi realizado com variação de 230-400 nm.

6.5 – Obtenção do Extrato de Mel

As substâncias fenólicas foram extraídas do mel segundo metodologia descrita previamente na literatura (FERRERES *et al.*, 1994; MARTOS *et al.*, 2000; TOMÁS-BARBERÁN, *et al.*, 2001) com algumas pequenas modificações (LIANDA, 2004). A amostra de mel (cerca de 50 g) foi misturada com 250 mL de água destilada, ajustada a pH = 2 com ácido clorídrico concentrado e agitada com agitador magnético, a temperatura ambiente, até completa dissolução. A amostra fluida foi em seguida, filtrada através de algodão para eliminar possíveis partículas suspensas. O filtrado foi agitado juntamente com cerca de 75 g de amberlite XAD-2 (poro 9 nm e partícula 0,3-1,2 mm) e, em seguida, empacotado em uma coluna de vidro (45 x 3,5 cm). A coluna foi então lavada primeiramente com água acidificada (pH = 2 com HCl concentrado, 100 mL), e subsequentemente, com água destilada (cerca de 150 mL) para remover todos os açúcares e outros constituintes polares do mel, enquanto as substâncias fenólicas permaneceram na

coluna. A fração fenólica adsorvida na coluna foi então eluída com metanol (cerca de 350 mL). O extrato metanólico obtido foi concentrado até a secra sob pressão reduzida em evaporador rotatório a 40°C. Após esta etapa, foi realizado o procedimento de extração no qual foram adicionados 15 mL de H₂O destilada ao extrato metanólico, em seguida fez-se a partição com dois solventes diferentes (cada coluna em um solvente): a) éter (TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 2001) e b) acetato de etila (DA SILVA, 2004; LIANDA, 2004; MONTAGNI, 2005). Após dez extrações (10 x 10 mL), as fases orgânicas foram reunidas, secas sob sulfato de sódio anidro e concentradas até secra em rotavapor a 40 °C. Em seguida, o extrato foi redissolvido em 5 mL de metanol grau espectroscópico, filtrado em membrana de 0,45 µm e analisado por CLAE. Na Figura 15, além do preparo do extrato fenólico, estão representadas também, as seqüências que foram usadas para os demais ensaios (fenóis e flavonóides totais, atividade antioxidante e análise melissopalínológica) feitos nesse trabalho.

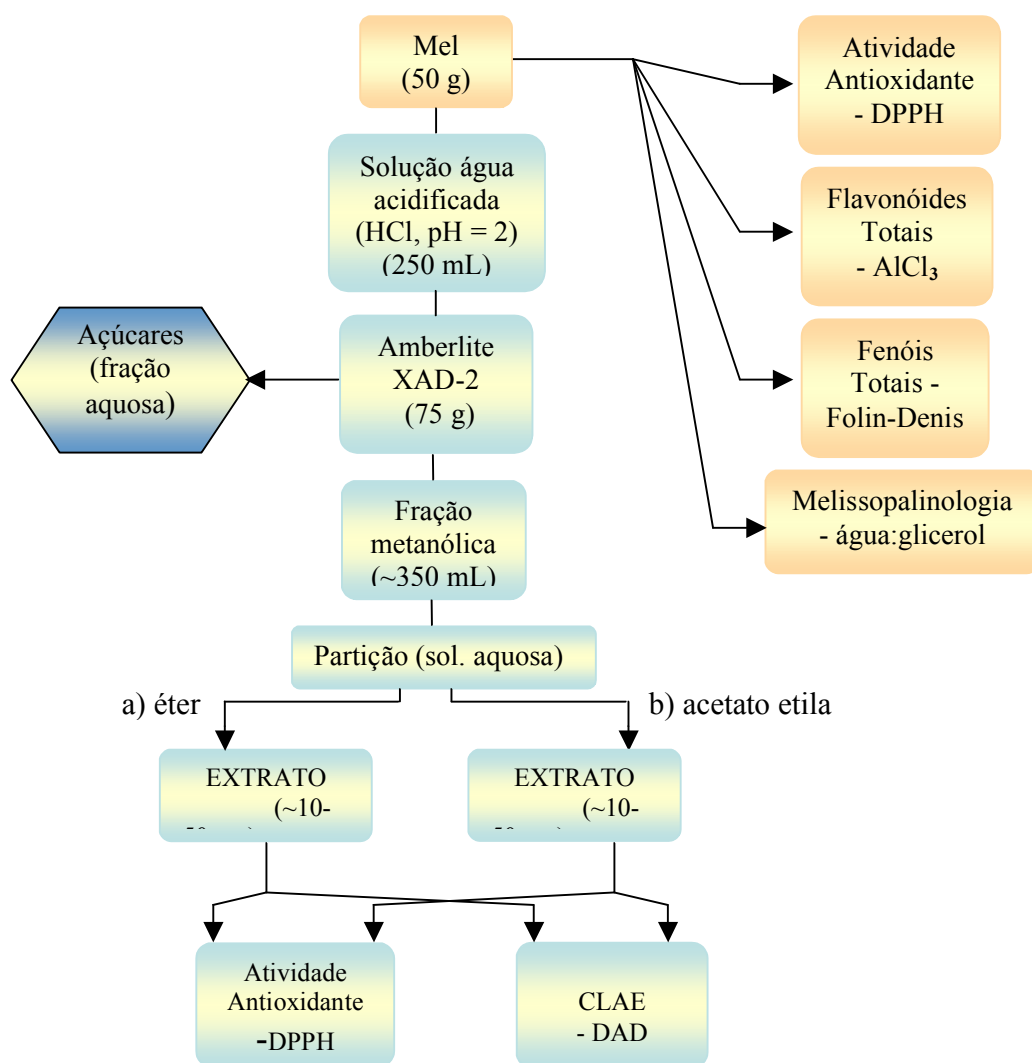


Figura 15. Preparo e análises das amostras de méis.

6.6 – Determinação do Teor de Fenóis Totais nos Méis

A concentração dos fenóis totais nos méis foi determinada pelo método espectrofotométrico descrito previamente na literatura (MEDA *et al.*, 2005), porém utilizando o reagente de Folin-Denis ao invés do reagente de Folin-Ciocalteu. Foram efetuados três ensaios para cada amostra, sendo apresentada a média, expressa em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 g de mel.

O reagente de Folin-Denis foi utilizado para a quantificação dos fenóis totais nas amostras de méis silvestres e laranjeiras. Solubilizou-se 100 mg do mel em 1 mL de água Milli-Q. A uma alíquota de 0,5 mL (utilizando micropipetas de 1000µL) dessa solução adicionou-se 2,5 mL de Reagente de Folin-Denis, após 5 minutos adicionou-se 2,0 mL de solução recém-preparada de carbonato de sódio 14%. Manteve-se a mistura incubada por 2h. Em seguida, fez-se a medida de sua absorvância a 760 nm, utilizando a água como branco (MEDA *et al.*, 2005; AHN *et al.*, 2007; KÜÇÜK *et al.*, 2007; PÉREZ *et al.*, 2007).

A seguir na Tabela 9 estão apresentados os valores das absorvâncias obtidos nos ensaios de fenóis totais realizados com os méis, em triplicata (e suas médias e desvios padrão). Os resultados calculados dos teores de fenóis totais dos méis estão apresentados na Tabela 22, p. 97.

Tabela 9. Valores das absorvâncias (triplicata), médias e desvios padrão dos méis silvestres e de laranjeira, nos ensaios de Folin-Denis.

Amostras - MÉIS	Leitura - UV- Abs. (760 nm)			Média Abs. ± DP*
	1º	2º	3º	
Méis silvestres				
RLS10	1,065	1,125	1,055	1,082 ± 0,03786
RLS12	0,633	0,663	0,607	0,634 ± 0,02802
RLS21	0,803	0,855	0,791	0,816 ± 0,03402
RLS23	0,748	0,811	0,765	0,775 ± 0,03259
Méis laranjeiras				
RLL03	0,558	0,639	0,603	0,600 ± 0,04058
RLL15	0,544	0,493	0,594	0,544 ± 0,05050
RLL16	0,547	0,608	0,594	0,583 ± 0,03195
RLL18	0,83	0,738	0,731	0,766 ± 0,05525
RLL19	0,495	0,52	0,551	0,522 ± 0,02805

* DP = desvio padrão

6.6.1 – Preparo do reagente de Folin-Denis

O reagente de Folin-Denis foi preparado, solubilizando-se 5 g de tungstato de sódio diidratado (Sigma-Aldrich), 1 g de ácido fosfomolibdico (Sigma-Aldrich) e 2,5 mL de ácido fosfórico (Sigma-Aldrich) em 38 mL de água Milli-Q. A mistura foi mantida sob refluxo por 2 horas, em seguida resfriou-se e diluiu-se a 50 mL em balão volumétrico, estocando no escuro. A solução apresentou coloração esverdeada (Official Methods of Analysis of the AOAC, 1950).

6.6.2 – Preparo da curva analítica com ácido gálico

Foi preparada uma curva analítica a partir da solução aquosa padrão de ácido gálico ($1 \text{ mg mL}^{-1} \equiv 0,0059 \text{ mM}$), a partir de alíquotas de diferentes volumes (2, 6, 8, 10, 20, 30, 50, 75 e 100 μL) que foram misturadas com 2,5 mL do reagente de Folin-Denis, e após 5 minutos adicionou-se 2,0 mL de solução recém-preparada de carbonato de sódio 14%. As leituras foram feitas contra um branco de água. A curva analítica foi construída a partir do programa Origin 6.0 (UFRRJ), onde foi efetuada a regressão linear e obtida a equação da reta [$y = a + b.x$], relacionando concentração de ácido gálico e absorvância de cada leitura a 760 nm. Através dessa equação determinou-se indiretamente o teor de fenóis totais nas amostras, onde se substituiu y pela média da absorvância de cada amostra de mel para se calcular x (concentração).

A seguir na Tabela 10 estão apresentados os dados que geraram o gráfico da curva analítica do ácido gálico apresentado na Figura 49, p. 96.

Tabela 10. Valores das diferentes concentrações da solução do padrão de ácido gálico, com suas absorvâncias (triplicata), médias e desvios padrão, nos ensaios de Folin-Denis.

Volume (μL)	[mg mL^{-1}]	Leitura UV - Abs. (760 nm)			Média Abs. $\pm$ DP*
		1°	2°	3°	
2	0,0004	0,147	0,147	0,138	0,144 $\pm$ 0,00520
6	0,0013	0,264	0,295	0,246	0,268 $\pm$ 0,02479
8	0,0018	0,309	0,35	0,311	0,323 $\pm$ 0,02312
10	0,0022	0,355	0,422	0,392	0,390 $\pm$ 0,03356
20	0,0044	0,622	0,597	0,619	0,613 $\pm$ 0,01365
30	0,0066	0,822	0,966	0,955	0,914 $\pm$ 0,08015
50	0,0110	1,435	1,594	1,464	1,498 $\pm$ 0,08468
75	0,0164	2,076	2,313	2,109	2,166 $\pm$ 0,12837
100	0,0217	2,755	3,012	2,757	2,841 $\pm$ 0,14781

* DP = desvio padrão

6.7 – Determinação do Teor de Flavonóides Totais nos Méis

O teor de flavonóides totais foi determinado segundo metodologia descrita na literatura (MEDA *et al.*, 2005) utilizando como reagente o cloreto de alumínio. A 3,0 ml da solução de mel em metanol (grau espectroscópico) ou metanol/água (conforme a concentração que variou de 300-800 mg·mL⁻¹) adicionou-se 3,0 mL de solução metanólica a 2% de cloreto de alumínio hidratado (Vetec). Após 30 minutos em repouso, leu-se as absorvâncias das soluções no comprimento de onda de 415 nm, contra o branco consistindo de 3 mL de solução de mel misturados a 3 mL de metanol sem cloreto de alumínio (MEDA *et al.*, 2005; AHN *et al.*, 2007).

A seguir na Tabela 11 estão apresentados os valores das absorvâncias obtidos nos ensaios de flavonóides totais realizados com os méis, em triplicata (e suas médias e desvios padrão). Os resultados calculados dos teores de flavonóides totais dos méis estão apresentados na Tabela 23, p. 100.

Tabela 11. Valores das absorvâncias (triplicata), médias e desvios padrão, dos méis silvestres e de laranjeira nos ensaios com cloreto de alumínio.

Amostras - MÉIS	[g·mL ⁻¹]	Leitura UV- Abs. (415 nm)			Média Abs. ± DP*
		1º	2º	3º	
Méis silvestres					
RLS10	0,8	-0,116	-0,155	-0,142	-0,138 ± 0,020
RLS12	0,8	0,017	0,018	0,02	0,018 ± 0,002
RLS21	0,6	0,27	0,246	0,221	0,246 ± 0,025
RLS23	0,3	0,311	0,351	0,38	0,347 ± 0,035
Méis laranjeiras					
RLL03	0,8	-0,001	-0,002	-0,002	-0,002 ± 0,001
RLL15	0,8	0,029	0,025	0,03	0,028 ± 0,003
RLL16	0,8	0,021	0,026	0,024	0,024 ± 0,003
RLL18	0,8	-0,057	-0,055	-0,06	-0,057 ± 0,003
RLL19	0,8	0,02	0,02	0,018	0,019 ± 0,001

* DP = desvio padrão

6.7.1 – Preparo da curva analítica com quercetina

A curva analítica foi feita a partir de uma solução padrão de quercetina em metanol (1,78 mg·mL⁻¹ ≡ 0,0059 mM). Em seguida foram coletadas alíquotas da solução original com diferentes volumes (2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 µL), às quais foram acrescentados 3,0 mL de solução de cloreto de alumínio 2%. Após 30 minutos em repouso,

leu-se as absorvâncias das soluções no comprimento de onda de 415 nm, contra o branco consistindo de 3,0 mL de solução de mel misturados a 3,0 mL de metanol sem cloreto de alumínio. A curva analítica foi feita a partir do programa Origin 6.0 (UFRRJ), efetuando-se a regressão linear sendo obtida a equação da reta [$y = a + b.x$], relacionando concentração de quercetina contra absorvância de cada leitura a 415 nm. Através dessa equação determinou-se indiretamente o teor de flavonóides totais nas amostras, onde se substituiu y pela média da absorvância de cada amostra de mel para se calcular x (concentração).

A seguir na Tabela 12 estão apresentados os dados que geraram o gráfico da curva analítica da quercetina apresentado na Figura 50, p. 99.

Tabela 12. Valores das diferentes concentrações da solução padrão de quercetina, com suas absorvâncias (triplicata), médias e desvios padrão, nos ensaios com cloreto de alumínio.

Volume (μ L)	[mg/mL]	Leitura UV- Abs. (415 nm)			Média Abs. $\pm$ DP*
		1°	2°	3°	
2	0,0012		0,057	0,049	0,053 $\pm$ 0,00566
4	0,0024	0,101	0,103	0,108	0,104 $\pm$ 0,00361
6	0,0036	0,187		0,199	0,193 $\pm$ 0,00849
8	0,0047	0,238	0,226	0,225	0,230 $\pm$ 0,00723
10	0,0059	0,324	0,339	0,312	0,325 $\pm$ 0,01353
15	0,0089	0,475	0,486		0,481 $\pm$ 0,00778
20	0,0118	0,625	0,658	0,586	0,623 $\pm$ 0,03604
25	0,0147	0,833	0,911	0,824	0,856 $\pm$ 0,04784
30	0,0176	0,993	1,028	1,014	1,012 $\pm$ 0,01762
40	0,0234	1,402	1,421	1,401	1,408 $\pm$ 0,01127

* DP = desvio padrão

6.8 – Determinação da Atividade Antioxidante com DPPH

6.8.1 – Atividade antioxidante dos méis, dos extratos e dos padrões fenólicos

A atividade antioxidante das substâncias presentes nos méis e seus extratos foi determinada por meio da capacidade sequestrante do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (MENSOR *et al.*, 2001). Na presença de um antioxidante, a coloração púrpura do DPPH decai, e a mudança de absorvância pode ser lida espectrofotometricamente (PÉREZ *et al.*, 2007). Para a determinação da atividade antioxidante dos méis e dos seus extratos, bem como dos padrões comerciais, foi utilizado solução metanólica 0,3 mM de DPPH. Para a determinação da atividade antioxidante

foram preparadas soluções metanólicas estoque dos padrões comerciais dos ácidos gálico, protocatecuico e *para*-cumárico e dos flavonóides quercetina, morina e rutina nas concentrações de 100 μM ; dos extratos (em metanol) na concentração de 0,1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e dos méis (solubilizados em metanol : água – 50:50) na concentração de 100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. A partir da concentração inicial foram feitas diluições para fornecer a faixa de melhor atividade. Os ensaios foram realizados em microplacas com 96 poços de 100 μL de volume, onde foram adicionados 71 μL da amostra ou do padrão e 29 μL da solução de DPPH (Figura 16), que correspondeu aos seis pontos nas concentrações de 71; 35,5; 17,75; 7,1; 0,71 e 0,071 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de amostra ou μM de padrão ou $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de mel. As leituras foram feitas após 30 minutos de incubação no escuro, em espectrofotômetro ELISA a 490 nm. O branco específico da amostra foi determinado usando 29 μL de metanol e 71 μL da amostra de cada concentração, e o controle positivo com 29 μL de DPPH e 71 μL de metanol. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

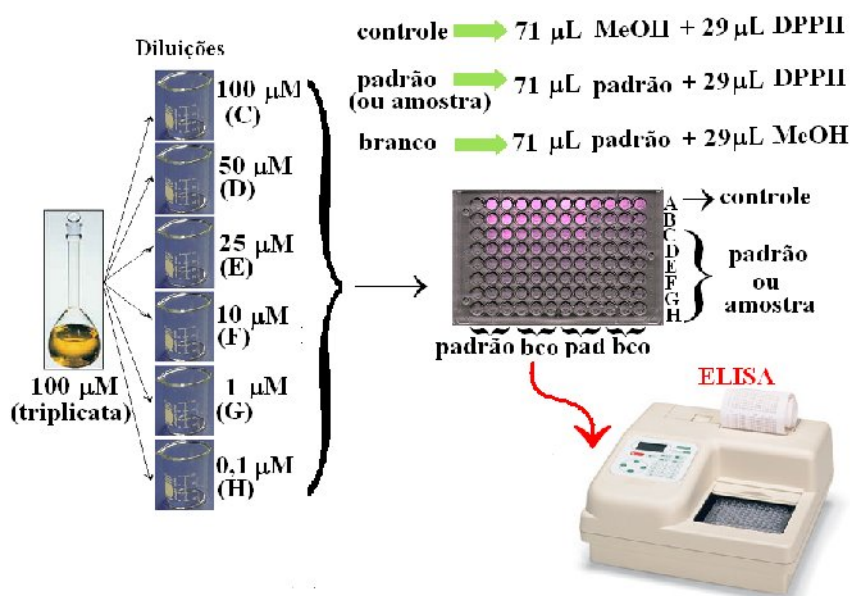


Figura 16. Esquema do ensaio de atividade antioxidante utilizando o espectrofotômetro ELISA.

A porcentagem de atividade de sequestrante (%AA) foi determinada segundo a fórmula abaixo (MENSOR *et al.*, 2001):

$$\%AA = 100 - [(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100] / Abs_{controle} \quad \text{onde,}$$

Abs = absorvância lida em 490 nm após 30 minutos de reação.

A_{amostra} = absorvância da solução de DPPH e a amostra a ser analisada (mel ou extrato).

A_{controle} = absorvância da solução de DPPH e metanol (solução controle positivo).

A_{branco} = absorvância da solução amostra (mel ou extrato) e metanol.

A atividade sequestrante do radical livre DPPH também foi expressa em termos de CE₅₀ (concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% da concentração inicial do DPPH), através da média obtida nos gráficos que relacionam o percentual de atividade contra a concentração da substância ensaiada. Desta forma, quanto menor o seu valor, maior é a capacidade antioxidante das substâncias presentes.

A seguir estão apresentados os resultados das triplicatas dos ensaios de atividade sequestradora do radical livre DPPH realizados com os padrões das substâncias fenólicas (Tabela 13), com os extratos (Tabela 14) e com os méis (Tabela 15), bem como suas médias e respectivos desvios padrão. Os valores desses ensaios em triplicata foram mostrados aqui para facilitar a visualização dos resultados finais (somente as médias) durante a discussão adiante em “resultados e discussão”.

Tabela 13. Valores de CE₅₀ (μM e μg mL⁻¹) obtidos para os padrões das substâncias fenólicas nos ensaios de atividade antioxidante pelo método do DPPH, suas médias e desvios padrão.

Padrões	CE ₅₀ Ensaio			Média Atividade Antioxidante (CE ₅₀) [μM ± DP*]	Média Atividade Antioxidante (CE ₅₀) [μg mL ⁻¹ ± DP*]
	1°	2°	3°		
Quercetina	3,19	3,01	3,30	3,17 ± 0,146	0,96 ± 0,044
Morina	16,23	16,03	16,77	16,34 ± 0,146	4,94 ± 0,042
Rutina	8,39	8,23	8,95	8,52 ± 0,377	5,20 ± 0,230
Ác. Gálico	5,84	5,53	5,47	5,61 ± 1,96	0,86 ± 0,030
Ác. Protocatecuico	10,67	11,86	11,55	11,36 ± 0,618	1,75 ± 0,095

* DP = desvio padrão

Tabela 14. Valores de CE₅₀ obtidos para os extratos de méis nos ensaios de atividade antioxidante pelo método do DPPH, suas médias e desvios padrão.

Amostras– EXTRATOS	CE ₅₀ Ensaio [µg·mL ⁻¹]			Média Atividade Antioxidante (CE ₅₀) [µg·mL ⁻¹ ± DP*]
	1º	2º	3º	
Méis silvestres				
RLS10	5,81	6,40	6,32	6,17 ± 0,32097
RLS12	25,75	26,28	26,28	26,10 ± 0,30398
RLS21	29,17	30,69	28,90	29,59 ± 0,96457
RLS23	32,50	31,31	28,00	30,60 ± 2,33251
Méis laranjeiras				
RLL03	54,21	58,01	46,39	52,87 ± 5,92344
RLL15	19,20	21,23	18,39	19,61 ± 1,46607
RLL16	29,67	30,73	28,80	29,74 ± 0,96717
RLL18	10,31	8,80	10,11	9,74 ± 0,82215
RLL19	23,17	19,90	20,60	21,22 ± 1,72052

* DP = desvio padrão

Tabela 15. Valores de CE₅₀ obtidos para os méis nos ensaios de atividade antioxidante pelo método do DPPH, suas médias e desvios padrão.

Amostras – MÉIS	CE ₅₀ Ensaio [mg·mL ⁻¹]			Média Atividade Antioxidante (CE ₅₀) [mg·mL ⁻¹ ± DP*]
	1º	2º	3º	
Méis silvestres				
RLS10	11,39	10,59	10,46	10,81 ± 0,50279
RLS12	17,96	20,12	21,13	19,74 ± 1,61882
RLS21	17,82	17,35	20,09	18,42 ± 1,46890
RLS23	18,50	16,33	17,74	17,52 ± 1,09953
Méis laranjeiras				
RLL03	35,98	32,58	31,08	33,21 ± 2,51332
RLL15	37,88	38,94	31,85	36,22 ± 3,82154
RLL16	41,43	35,83	45,12	40,80 ± 4,67728
RLL18	26,95	30,39	32,20	29,85 ± 2,66487
RLL19	56,33	47,35	54,24	52,64 ± 4,70035

* DP = desvio padrão

6.9 – Análise Melissopalinológica

6.9.1 – Preparo das lâminas para avaliação no microscópio

Cada amostra de mel (cerca de 10 g) foi dissolvida em 20 mL de água destilada em um béquer. Essa solução foi dividida em dois tubos de centrifuga, os quais foram centrifugados por 15 minutos (1500 a 2000 rpm). No caso de amostra muito viscosa ou que apresentou pouco pólen (o qual fica depositado no fundo do tubo após a centrifugação), foi adicionado novamente 5 mL de água destilada e submetido à centrifugação por mais 10 minutos, descartando-se o sobrenadante em seguida. Em seguida, descartou-se o sobrenadante de cada tubo (virando o tubo de uma vez), adicionou-se, a cada tubo, 5 mL de solução aquosa de glicerol 50% e após repouso por 30 minutos, centrifugou-se por 10 minutos e descartou-se o sobrenadante novamente. Os tubos são deixados virados para baixo para secagem da solução de glicerol (quanto mais seco estiver o pólen extraído, mais facilmente será manuseado e melhor ficará também a lâmina para leitura). O resíduo polínico que fica no fundo do tubo, foi retirado com gelatina glicerinada, que foi espetada com alça de ponta de platina esterilizada, para ser aplicado à lâmina de microscópio. A lâmina foi colocada sobre uma placa de aquecimento a mais ou menos 40°C para derreter a gelatina contendo o pólen, em seguida, a lâmina foi vedada com lamínula e parafina. Cada amostra de mel foi preparada em triplicata. (DAG *et al.*, 2006 ; SAÁ-OTERO *et al.*, 1993).

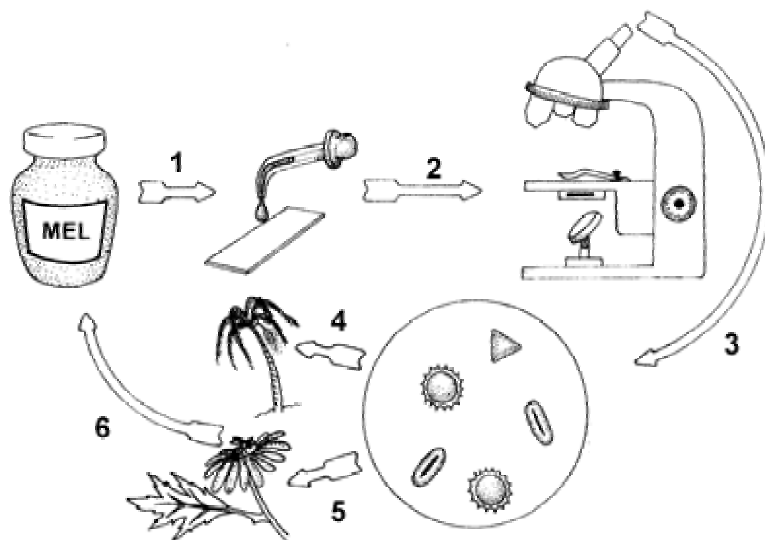
6.9.2 – Identificação dos tipos polínicos

As lâminas foram observadas em microscópio para a identificação dos grãos de pólen através de sua morfologia. De acordo com a recomendação de Saá-Otero *et al.* (1993), no mínimo 500 grãos de pólen por amostra, devem ser contados e identificados para determinar a composição polínica percentual do mel (Figura 17).

A interpretação dos tipos polínicos obtidos foi realizada pela Pesquisadora Dra. Leila Nunes Morgado do Laboratório ABELHA-NATUREZA, no Instituto de Zootecnia da UFRRJ.

Em resumo, levando-se em consideração na análise polínica de amostras de mel a participação de pólen anemófilo e polínifero, bem como a relação quantitativa entre o pólen das plantas nectaríferas e suas propriedades de sub- e super-representação, obtêm-se um diagnóstico mais próximo à verdadeira procedência do mel (BARTH, 2004).

Buscou-se verificar a dominância de no mínimo 45% de algum tipo polínico, de *Eucalyptus* (Myrtaceae) e de *Citrus* (Rutaceae), para determinar a florada do mel; em caso contrário, classificá-lo como mel silvestre (heterofloral).



Legenda: 1. O mel é colocado sobre uma lâmina para ser observado em microscópio (2). 3. Uma idéia da variedade de formas e tipos de grãos de pólen que podemos encontrar. 4 e 5. Pode-se verificar a qual espécie vegetal pertence o grão encontrado, através de comparação com o polinário de referência. Dependendo da frequência com que os grãos apareceram na lâmina pode-se afirmar que a espécie vegetal em questão é uma importante fonte de néctar (6) para o mel estudado.

Figura 17. Etapas de identificação dos grãos de pólen presentes no mel (<http://www.webbee.org.br/pesquisa/melissopalino.htm>).



Figura 18. Fotomicrografia de grãos de pólen de diferentes espécies vegetais (<http://www.apicoltura2000.it/riviste/meditmelis.htm>).

7 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil cromatográfico de polifenóis em méis brasileiros de *Apis mellifera* tem despertado o interesse de nossa equipe de pesquisa, em busca de marcadores químicos que auxiliem na determinação das origens botânica e geográfica. Os méis analisados nestes trabalhos de dissertações foram de origem de espécies de eucalipto e silvestre dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo (DA SILVA, 2004), os méis de laranjeira e silvestre dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, inclusive de origem provável da Mata Atlântica (LIANDA, 2004), méis silvestres, de assa-peixe e de macieira de diferentes estados brasileiros (MONTAGNI, 2005). Com a finalidade de dar continuidade à investigação de marcadores químicos de origem botânica e geográfica para os diferentes méis brasileiros, bem como avaliar a atividade antioxidante, o presente trabalho avaliou méis monoflorais de laranjeira e eucalipto, além de méis silvestres da Mata Atlântica.

Os ácidos fenólicos e flavonóides foram as classes de substâncias escolhidas nas análises dos méis brasileiros, porque já foram reconhecidas, previamente, como sendo potencialmente úteis como marcadores taxonômicos em méis europeus (TAN *et al.*, 1989; ANDRADE *et al.*, 1997; DATTA *et al.*, 2003), e nos méis brasileiros (DA SILVA, 2004; LIANDA, 2004; MONTAGNI, 2005), bem como pelo fato dessas substâncias apresentarem comprovadas atividades antioxidantes, antitumorais, antimicrobianas e antibacterianas (AL-MAMARY *et al.*, 2002; ALJADI & KAMARUDDIN, 2003; MIORIN *et al.*, 2003; PRIOR, 2003; KAMPA *et al.*, 2004; ALJADI & KAMARUDDIN, 2004; CUSHNIE & LAMB, 2005; TSIMOGIANNIS & OREOPOULOU, 2006; SIDDHURAJU & BECKER, 2007).

Os processos clássicos baseados em cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) e cromatografia em coluna aberta (CC) foram utilizados para a separação e purificação das substâncias fenólicas, em paralelo à cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de fotodiodo (CLAE-DAD) para a identificação de tais substâncias.

Nesse trabalho serão apresentados os resultados da avaliação da atividade antioxidante de amostras de méis que tiveram seus perfis cromatográficos estudadas anteriormente (LIANDA, 2004). Além dessas amostras, novos méis foram obtidos e tiveram seus perfis cromatográficos e a suas atividades antioxidantes estudadas.

7.1 – Estudo Melissopalínológico

As plantas nectaríferas compreendem um grande número de espécies variando de região para região (BARTH 1989, 2004). No Sudeste brasileiro, dentre as cultivadas salientam-se para a produção de mel as flores das plantas cítricas (*Citrus* sp.), tais como laranjeira, bem como as de eucalipto, destacam-se numerosas espécies de *Asteraceae*, entre as quais o assa-peixe, *Hytis*, *Mikania*, *Epatorium* (BARROS, 1962; BARTH, 1989; CORTOPASSI-LAURINO & RAMALHO, 1988; MORETI *et al.*, 2002).

Para a realização da Melissopalínologia foi necessário a preparação dos grãos de pólen dos méis para poderem ser analisados pelo exame microscópico. Esta análise constitui-se em reconhecer os tipos polínicos encontrados nas amostras de mel e a partir

deles chegar às espécies vegetais que os produziram, bem como à vegetação de interesse apícola ao redor de um apiário.

Nas Tabelas 16 e 17 estão apresentados dados referentes aos totais de grãos de pólen das espécies de eucalipto e de laranjeira, respectivamente, conforme laudo fornecido, o qual está em anexo 2, p. 156.

Primeiramente foram agrupados quantitativamente os grãos de pólen das espécies nectaríferas por subtração do pólen das plantas anemófilas e poliníferas. Sobre este total de pólen nectarífero calcularam-se os respectivos percentuais de cada táxon nectarífero.

Tabela 16. Resultados obtidos pelas análises dos tipos polínicos nos méis de eucalipto, realizadas no IZ-UFRRJ, 2008, laudo em anexo 2, p. 156.

Amostras - MÉIS	Total de grãos de pólen	Total de grãos de pólen <i>Eucalyptus</i>	% de grãos de pólen <i>Eucalyptus</i>
RLE34	2122	1780	83,9
RLE35	4807	3767	78,4
RLE36	3031	1729	57,04

Tabela 17. Resultados obtidos pelas análises dos tipos polínicos nos méis de laranjeira, realizadas no IZ-UFRRJ, 2008, laudo em anexo 2, p. 156.

Amostras - MÉIS	Total de grãos de pólen	Total de grãos de pólen <i>Citrus</i>	% de grãos de pólen <i>Citrus</i>
RLL16	309	226	73,1
RLL18	450	286	63,5
RLL22	516	266	51,5
RLL25	1614	293	18,1
RLL26	3	SEM PÓLEN	-
RLL27	553	315	57
RLL28	931	668	71,7
RLL29	992	652	65,7
RLL30	1214	960	79,1
RLL31	504	378	75
RLL32	601	539	89,7
RLL40	517	355	68,7
RLL41	562	275	49

De acordo com os resultados apresentados por esta técnica, observou-se que os três méis de eucalipto (**RLE34, RLE35 e RLE36**) apresentaram porcentagem de grãos de pólen de *Eucalyptus* superiores a 45%, indicando assim, que são oriundos das floradas indicadas em seus rótulos. Quanto aos treze méis de laranjeira analisados apenas dois deles não apresentaram predominância de grãos de pólen de *Citrus*, a **RLL25** com apenas 18,1 % e a **RLL26** que continha apenas três grãos de pólen no total, não sendo estes de *Citrus*.

Em resumo, levando-se em consideração na análise polínica de amostras de mel a participação de pólen anemófilo e polinífero, bem como a relação quantitativa entre o pólen das plantas nectaríferas e suas propriedades, obtém-se um diagnóstico que pode se aproximar da verdadeira procedência do mel.

Na Figura 19 a seguir estão exemplificadas as fotografias referentes a duas lâminas de amostras eucalipto e laranjeira avaliadas por microscopia, respectivamente.

A



B

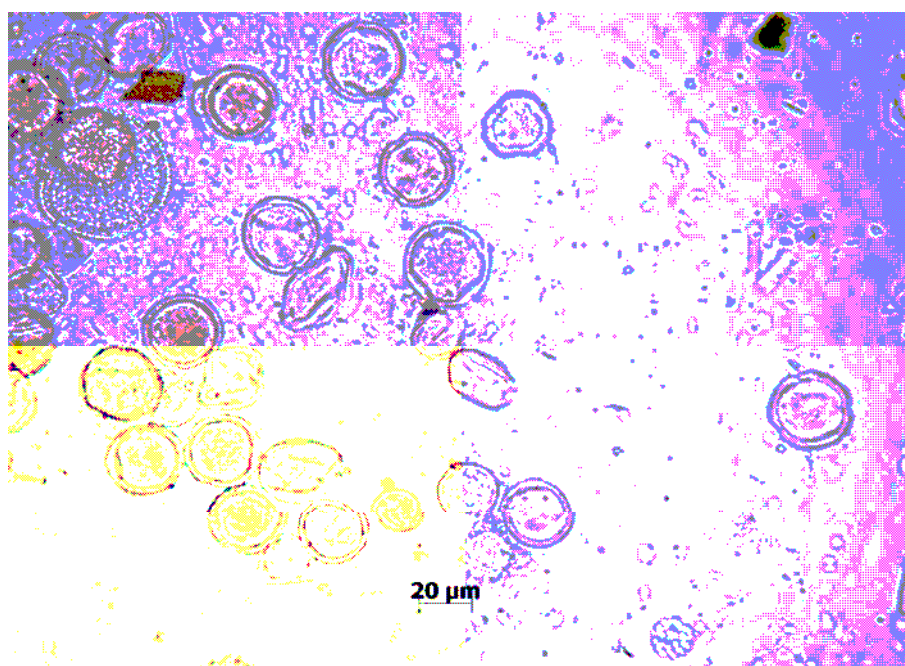


Figura 19. Fotografias das lâminas avaliadas ao microscópio contendo grãos de pólen A) *Eucalyptus* e B) *Citrus*.

7.2 – Avaliação da Atividade Antioxidante

Muitas substâncias naturais, obtidas de alimentos, têm sido identificadas como sequestradoras de espécies reativas de oxigênio, protegendo o corpo humano dos efeitos destes, bem como retardando o aparecimento de muitas doenças crônicas (MEDA *et al.*, 2005).

As substâncias com propriedades antioxidantes são utilizados na conservação dos alimentos e referenciadas como benéficas para a saúde, por serem eficientes captadores radiculares, como demonstrado por AL-MAMARY *et al.* (2002); ALJADI & KAMARUDDIN (2003); MIORIN *et al.* (2003); PRIOR, 2003; ALJADI & KAMARUDDIN (2004); MEDA *et al.* (2005).

O mel é reconhecido como fonte de compostos fenólicos, sendo que os méis heteroflorais (silvestres) e monoflorais (laranjeiras), objetos deste estudo, apresentaram consideráveis quantidades desta categoria de substâncias, encontrados com maior concentração nos extratos dos méis silvestres.

Uma das propriedades mais interessantes do mel é a atividade antioxidante, destacando-se os ácidos fenólicos e flavonóides presentes, considerados os principais antioxidantes naturais desse alimento. O uso deste parâmetro pode ser utilizado para assegurar a qualidade e o possível potencial terapêutico dos méis. Danos oxidativos irreversíveis de biomoléculas são alguns dos fatores que causam a ocorrência e desenvolvimento de numerosas doenças degenerativas. O ensaio com o radical DPPH é um método bastante utilizado para a determinação da atividade sequestradora de radicais de extratos vegetais e compostos puros, por ser de fácil e rápida execução. Sendo assim, essa etapa do trabalho visou investigar essa atividade de méis brasileiros de *Apis mellifera*, bem como de seus extratos. A quantificação da atividade antioxidante pode ser utilizada para assegurar a qualidade e o possível potencial terapêutico dos méis.

7.2.1 – Avaliação da atividade antioxidante dos padrões fenólicos

A atividade antioxidante foi avaliada pela determinação da captação do radical DPPH (CE₅₀) pelos padrões de ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido *para*-cumárico, quercetina, rutina e morina e pelos extratos e amostras dos méis. As substâncias fenólicas foram selecionadas de acordo com o perfil apresentado por CLAE dos extratos de méis estudados anteriormente (LIANDA, 2004). Esses foram os únicos flavonóides encontrados (quercetina, morina e rutina) e foram selecionados devido às suas estruturas serem favoráveis para o sequestro do radical DPPH; e entre todos os ácidos fenólicos encontrados, os derivados do ácido benzóico (gálico e protocatecuico) foram selecionados pelo mesmo motivo e, ainda, foi escolhido o derivado do ácido cinâmico (*para*-cumárico) por ter aparecido com frequência nas amostras de méis de laranja, podendo vir a ser indicado como marcador químico de origem floral. Desta forma, despertou-se a curiosidade de avaliar-se a atividade antioxidante de um possível marcador químico.

O mecanismo das reações que envolve os flavonóides com o radical DPPH já foi discutido anteriormente (Figura 12, p. 26), inclusive especificamente da quercetina e rutina.

Quanto à morina, que se diferencia da quercetina apenas nas posições das duas hidroxilas no anel B, (*orto* para quercetina, posições 3' e 4' e *meta* para morina, posições 2' e 4'), foi observada uma atividade antioxidante menor quando comparada a quercetina, que tem as *orto*-hidroxilas que são muito reativas e favorecem a geração da *orto*-quinona logo no primeiro estágio (rápido) da reação com o DPPH e a formação de “*meta*-quinonas” não é possível, como é o caso da morina agindo como sequestradora de radicais livres (Figura 20), mantendo-a na forma de radical. Observando os ácidos fenólicos escolhidos, aguardou-se um melhor resultado do ácido gálico, seguido do protocatecuico e por último o *para*-cumárico. Devido às hidroxilas vizinhas tanto o ácido gálico quanto o ácido protocatecuico geram uma *orto*-quinona a partir do seu radical após ter doado hidrogênio, porém o ácido gálico com uma hidroxila a mais, deve levar a formação da *orto*-quinona mais rapidamente (Figuras 21 e 22). Já o ácido *para*-cumárico, com uma hidroxila apenas não possibilita a geração da quinona, mantendo-se assim, como radical; além de apresentar menos estruturas de ressonância em relação aos outros dois ácidos (Figura 23). Comparando-se os ácidos com os flavonóides, os ácidos gálico e protocatecuico devem apresentar melhor resultado que a morina que se mantém como radical fenoxila, enquanto os ácidos formam a *orto*-quinona. A quercetina e a rutina também devem apresentar resultados melhores que a morina, mesmo sem a rutina apresentar a hidroxila na posição 3 (anel C), pois ambas podem formar *orto*-quinona (hidroxilas em 3' e 4', anel B).

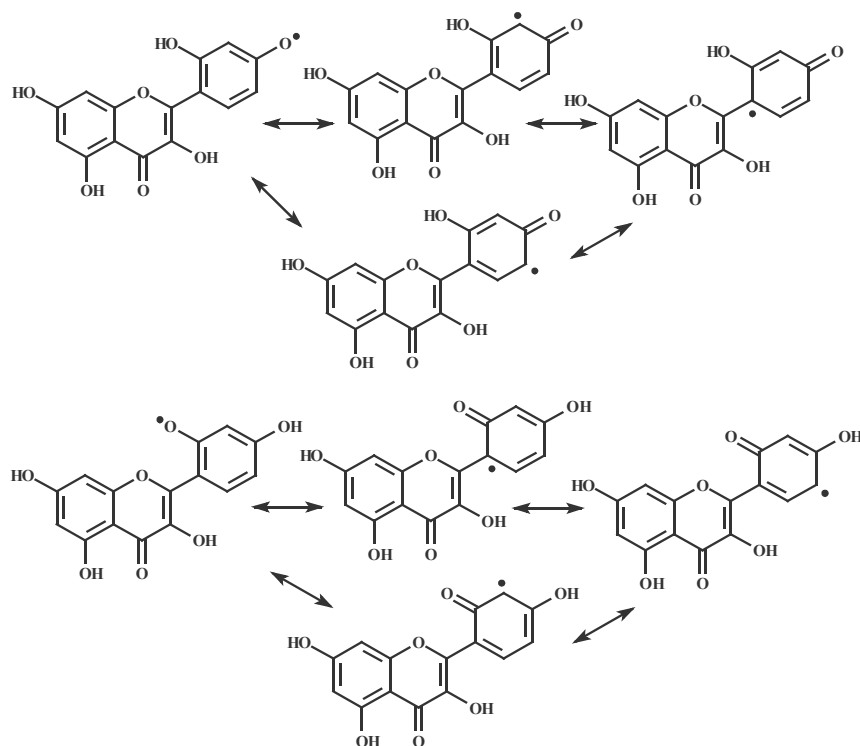


Figura 20. Morina agindo como sequestrador de radicais livres sendo estabilizado por ressonância.

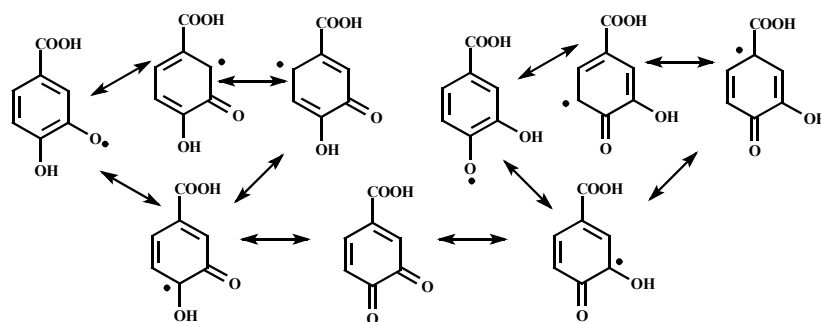


Figura 21. Ácido protocatecuico agindo como sequestrador de radicais livres formando *orto*-quinona.

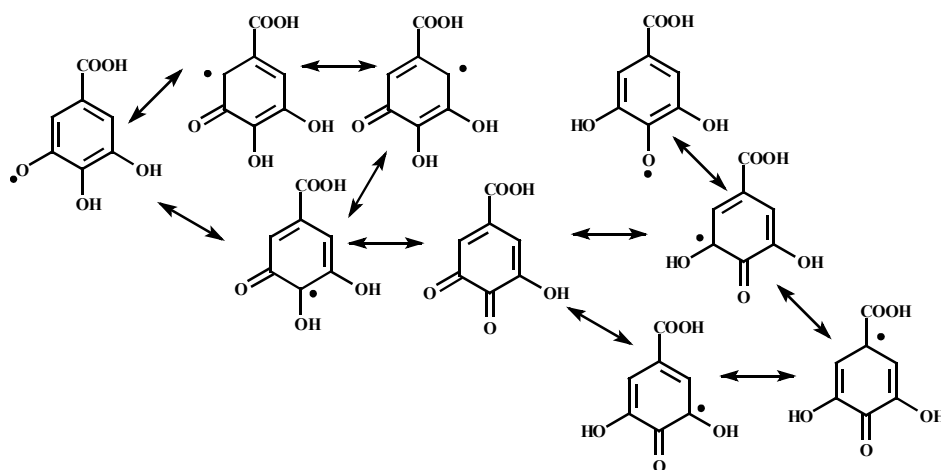


Figura 22. Ácido gálico agindo como sequestrador de radicais livres e formando *orto*-quinona.

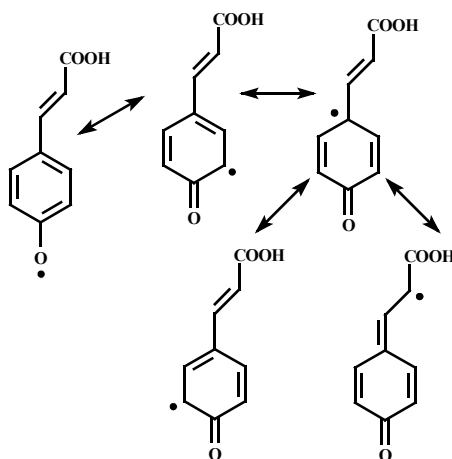


Figura 23. Ácido *para*-cumárico agindo como sequestrador de radicais livres, sem a formação da quinona.

Após todas essas considerações teóricas sobre estruturas das substâncias fenólicas e suas relações com a capacidade sequestradora de radicais livres, foram avaliadas as atividades antioxidantes desses padrões através do método da captura do radical DPPH (p. 51). A determinação do CE₅₀ foi obtida por regressão linear dos pontos plotados graficamente. Para a plotagem dos pontos, foram utilizados os valores das médias obtidas de triplicatas realizadas para cada um dos testes.

A partir daqui serão apresentados cada resultado individualmente, e para demonstrar o ensaio detalhadamente, a quercetina será usada para exemplificar.

a) Quercetina

Segundo a metodologia citada, foram preparadas soluções-estoque dos padrões na concentração de 100 µM e foram feitas algumas diluições aleatórias para uma primeira avaliação (em triplicata) em busca do CE₅₀. Nos três ensaios, o CE₅₀ foram encontradas na faixa de concentração entre 0,71 e 7,10 µM. Assim, os ensaios para a quercetina foram realizados a partir de uma solução-estoque preparada na concentração de 10 µM. O Quadro 1 mostra o 1º ensaio, destacando-se, em negrito, a faixa que inclui o valor de CE₅₀. Observa-se à direita, destacado em negrito, a concentração efetiva entre 40,2 e 52,5 % (onde se encontra os 50%) e à esquerda, destacadas as correspondentes concentrações da quercetina, 1,78 µM e 3,55 µM, necessárias para sequestrar os correspondentes percentuais da concentração do radical DPPH presente na solução.

1º ENSAIO		Controle negativo - DPPH				média	
ABS →		0,16	0,171	0,161	0,159	0,1628	
		ABS	ABS	ABS	ABS		
[diluições]	[microplaca]		amostra 1			média	% AA
10 µM	7,1 µM	C	0,079	0,068	0,066	0,071	78,90
7,5 µM	5,33 µM	D	0,085	0,085	0,109	0,093	64,57
5 µM	3,55 µM	E	0,108	0,124	0,11	0,114	52,48
2,5 µM	1,78 µM	F	0,133	0,138	0,131	0,134	40,19
			branco 1				
10 µM	7,1 µM	C	0,038	0,037	0,035	0,0367	
7,5 µM	5,33 µM	D	0,036	0,036	0,034	0,0353	
5 µM	3,55 µM	E	0,035	0,038	0,037	0,0367	
2,5 µM	1,78 µM	F	0,036	0,038	0,036	0,0367	

Quadro 1. Esquema das leituras (absorvâncias) das amostras de **quercetina** em microplacas, as concentrações e valores de %AA, do 1º ensaio.

Os dados obtidos no 1º ensaio foram utilizados para a construção do gráfico (Figura 24) que relaciona o percentual de atividade e a concentração da substância ensaiada, no caso a quercetina. Juntamente com o gráfico, obtiveram-se a equação da reta, o coeficiente de correlação (R), nível de significância (p), desvio padrão e números de pontos, que permitiram o cálculo do valor exato de CE₅₀, como exemplificado a seguir:

$$Y = A + B \cdot X$$

$$50 = 26,98 (\pm 1,01) + 7,22 (\pm 0,21) \text{ CE}_{50}$$

$$\text{CE}_{50} = 3,19 \mu\text{M}$$

Portanto, este foi o primeiro resultado da triplicata referente à atividade antioxidante da quercetina padrão. Este valor foi reunido com os demais na Tabela 13, p. 53.

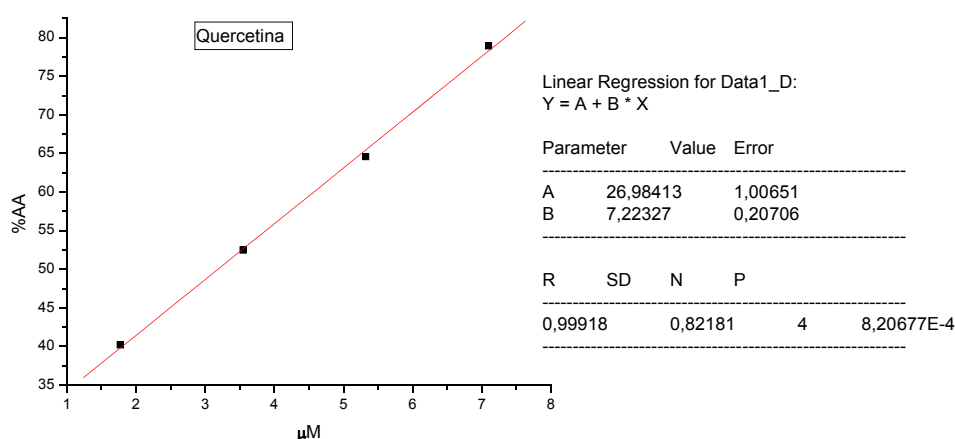


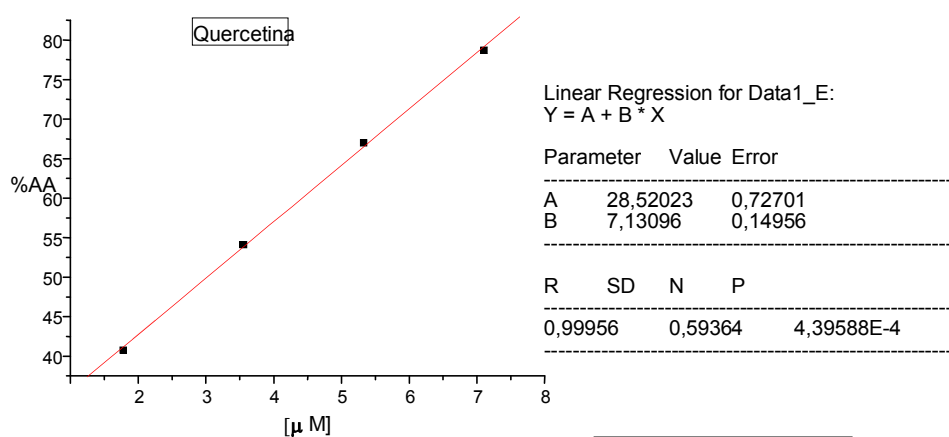
Figura 24. Gráfico que relaciona o percentual de atividade antioxidante e a concentração da quercetina no 1º ensaio.

O Quadro 2 mostra o 2º ensaio da triplicata referente à atividade antioxidante da quercetina como padrão e a Figura 25 mostra o gráfico gerado e o valor de CE₅₀ calculado.

<u>2º ENSAIO</u>	Controle negativo - DPPH					média
	ABS →	0,16	0,171	0,161	0,159	0,1628

			ABS	ABS	ABS	ABS	
[diluções]	[microplaca]		amostra 2			média	% AA
10 µM	7,1 µM	C	0,072	0,071	0,069	0,0707	78,70
7,5 µM	5,33 µM	D	0,09	0,087	0,086	0,0877	67,03
5 µM	3,55 µM	E	0,11	0,112	0,107	0,1097	54,12
2,5 µM	1,78 µM	F	0,132	0,133	0,132	0,1323	40,81
			branco 2				
10 µM	7,1 µM	C	0,038	0,035	0,035	0,036	
7,5 µM	5,33 µM	D	0,033	0,035	0,034	0,034	
5 µM	3,55 µM	E	0,036	0,034	0,035	0,035	
2,5 µM	1,78 µM	F	0,036	0,036	0,036	0,036	

Quadro 2. Esquema das leituras (absorvâncias) das amostras de **quercetina** em microplacas, as concentrações e valores de %AA, do 2º ensaio.



$$50 = 28,52 (\pm 0,73) + 7,13 (\pm 0,15) \text{ CE}_{50}$$

$$\text{CE}_{50} = 3,01 \text{ } \mu\text{M}$$

Figura 25. Gráfico que relaciona o percentual de atividade antioxidante e a concentração da quercetina no 2º ensaio.

No 3º ensaio foi incluído mais um ponto correspondendo à concentração de 10,65 μM , e desses foram retirados quatro pontos para a construção do gráfico. O Quadro 3 ilustra o detalhamento do ensaio, bem como a Figura 26 o gráfico gerado e o valor de CE_{50} , sendo este o terceiro valor da triplicata da atividade antioxidante da quercetina padrão.

Os três valores de CE_{50} da quercetina foram reunidos na Tabela 13, p. 53, sendo calculadas as médias, bem como indicados os desvios padrão (foram considerados apenas os valores que não ultrapassaram 10% da média), juntamente com os resultados dos outros padrões. Nessa tabela também foi apresentada a conversão desses resultados para a unidade de medida $\mu\text{g mL}^{-1}$, com o intuito deles poderem ser utilizados como parâmetro de comparação para os extratos e méis, posteriormente. Os valores das médias dos CE_{50} da quercetina são apresentados repetidamente na Tabela 18, p. 74 para fins de discussão.

3º ENSAIO		Controle negativo - DPPH				média	
		0,157	0,169	0,15	0,162	0,1595	
ABS →		ABS	ABS	ABS	ABS	ABS	
[diluções]	[microplaca]		amostra 3				% AA
15 μM	10,65 μM	D		0,051	0,053	0,052	89,34
10 μM	7,1 μM	E		0,072	0,075	0,0735	76,28
7,5 μM	5,33 μM	F	0,096		0,095	0,0955	62,91
5 μM	3,55 μM	G	0,118	0,107	0,108	0,111	54,44
2,5 μM	1,78 μM	H	0,127	0,145	0,137	0,1363	37,93
			branco 3				
15 μM	10,65 μM	D	0,035	0,036	0,034	0,035	
10 μM	7,1 μM	E	0,037	0,035	0,035	0,0357	
7,5 μM	5,33 μM	F	0,037	0,036	0,036	0,0363	
5 μM	3,55 μM	G	0,038	0,038	0,039	0,0383	
2,5 μM	1,78 μM	H	0,039	0,037	0,036	0,0373	

Quadro 3. Esquema das leituras (absorvâncias) das amostras de **quercetina** em microplacas, as concentrações e valores de %AA, do 3º ensaio.

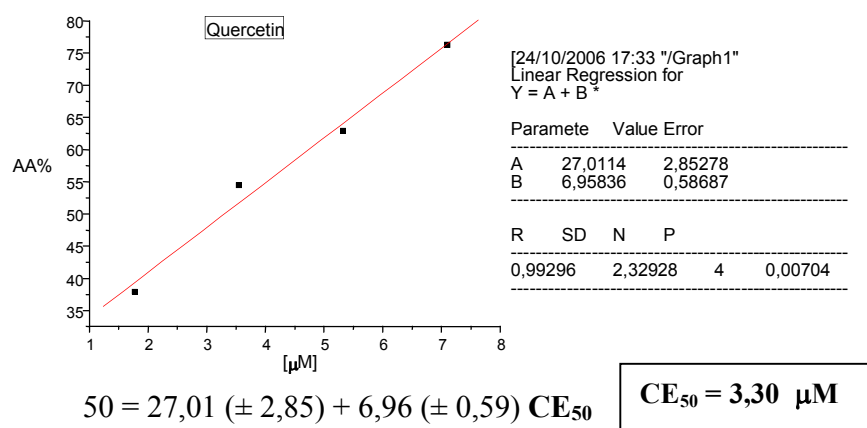


Figura 26. Gráfico que relaciona o percentual de atividade antioxidante e a concentração da quercetina no 3º ensaio.

b) Morina

A partir daqui não serão demonstrados os detalhes dos ensaios, e sim os resultados definitivos, dentro da faixa já determinada, a qual variou de 3,55 μM a 35,50 μM para a morina. A Figura 27 mostra os gráficos gerados a partir dos três ensaios realizados com a morina e seus valores de CE_{50} calculados.

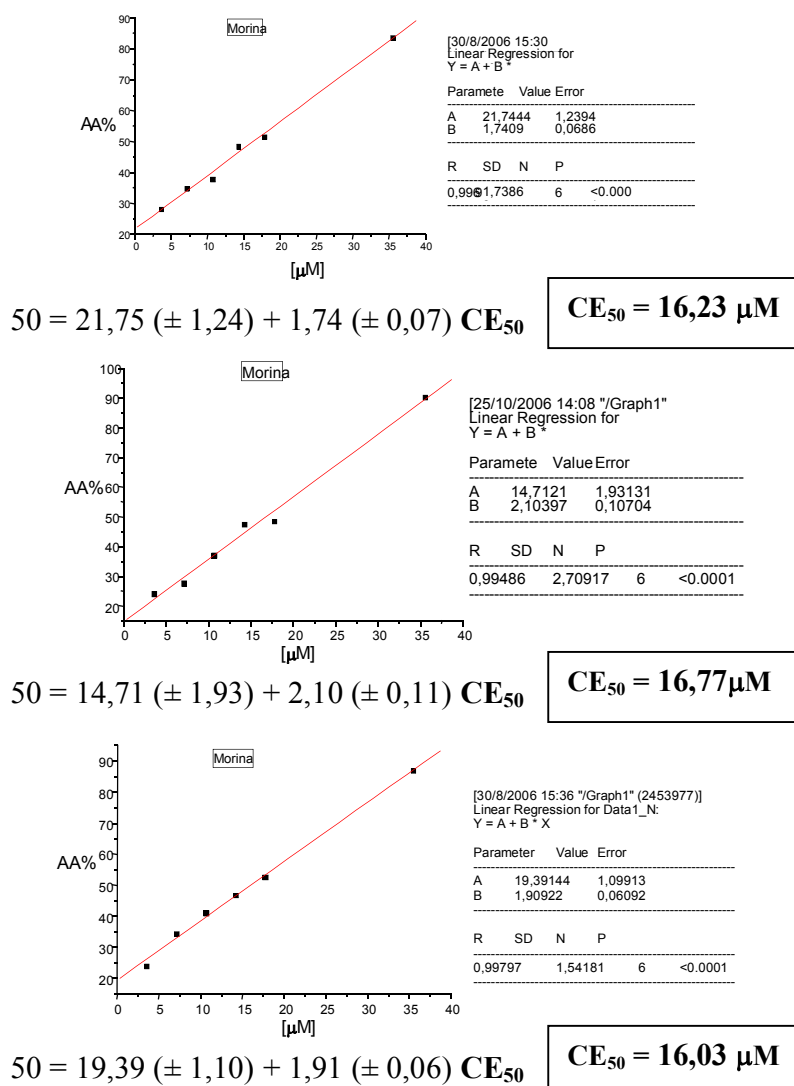


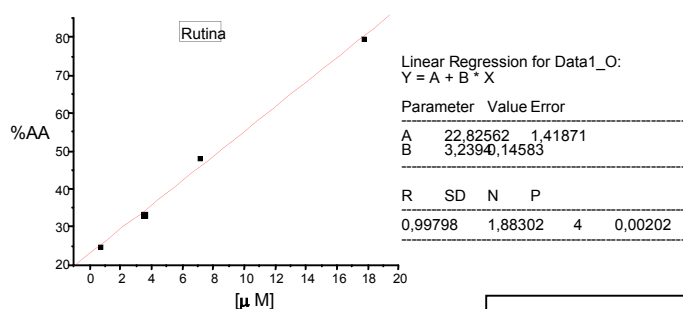
Figura 27. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração da **morina**, equações das retas e os seus valores de CE_{50} calculados para os três ensaios da triplicata.

Os três valores de CE_{50} da morina foram reunidos na Tabela 13, p. 53, sendo calculadas as médias e indicados os desvios padrão, juntamente com os resultados dos

demais padrões. Os valores das médias são apresentados repetidamente na Tabela 18, p. 74 para fins de discussão.

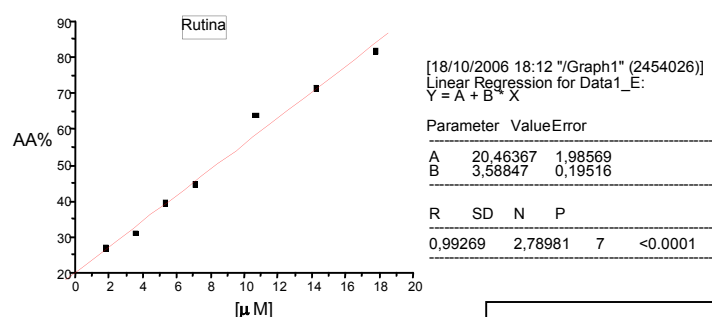
c) Rutina

A melhor faixa de concentração para a determinação do CE_{50} da rutina variou de 0,71 μM a 17,75 μM . A Figura 28 mostra os gráficos gerados a partir dos três ensaios realizados com a rutina e seus valores de CE_{50} calculados.



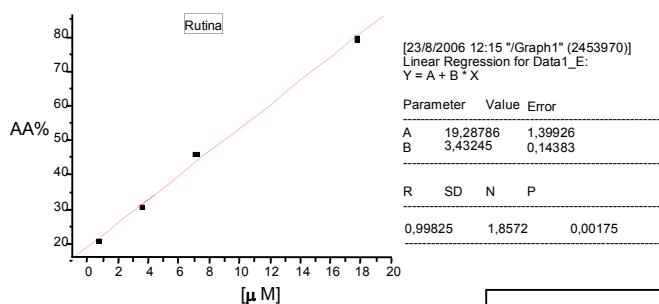
$$50 = 22,83 (\pm 1,42) + 3,24 (\pm 0,15) CE_{50}$$

$$CE_{50} = 8,39 \mu\text{M}$$



$$50 = 20,47 (\pm 1,99) + 3,59 (\pm 0,20) CE_{50}$$

$$CE_{50} = 8,23 \mu\text{M}$$



$$50 = 19,29 (\pm 1,40) + 3,43 (\pm 0,14) CE_{50}$$

$$CE_{50} = 8,95 \mu\text{M}$$

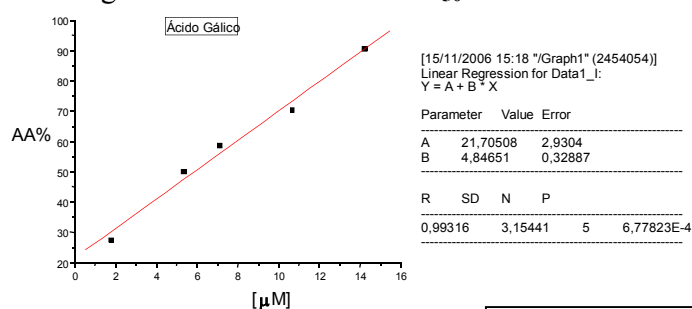
Figura 28. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração da **rutina**, equações das retas e os seus valores de CE_{50} calculados para os três ensaios da triplicata.

Os três valores de CE_{50} da rutina foram reunidos na Tabela 13, p. 53, sendo calculadas as médias e indicados os desvios padrão, juntamente com os resultados dos

outros padrões. Os valores das médias são apresentados repetidamente na Tabela 18, p. 74 para fins de discussão.

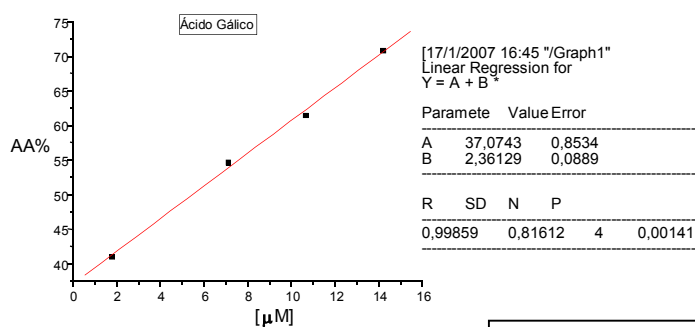
d) Ácido gálico

A melhor faixa de concentração para a determinação do CE_{50} do ácido gálico variou de 1,78 μM a 14,20 μM . A Figura 29 mostra os gráficos gerados a partir dos três ensaios realizados com o ácido gálico e seus valores de CE_{50} calculados.



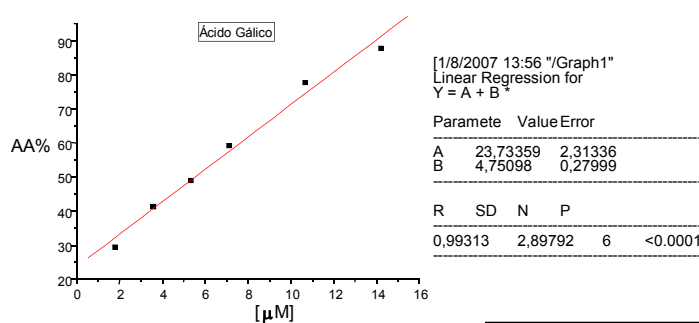
$$50 = 21,71 (\pm 2,93) + 4,85 (\pm 0,33) CE_{50}$$

$$CE_{50} = 5,84 \mu\text{M}$$



$$50 = 37,08 (\pm 0,85) + 2,36 (\pm 0,09) CE_{50}$$

$$CE_{50} = 5,48 \mu\text{M}$$



$$50 = 23,74 (\pm 2,31) + 4,75 (\pm 0,28) CE_{50}$$

$$CE_{50} = 5,53 \mu\text{M}$$

Figura 29. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do **ácido gálico**, equações das retas e os seus valores de CE_{50} calculados para os três ensaios da triplicata.

Os três valores de CE_{50} do ácido gálico foram reunidos na Tabela 13, p. 53, bem como suas médias e desvios padrão, juntamente com os resultados dos outros padrões. Os valores das médias são apresentados repetidamente na Tabela 18, p. 74 para fins de discussão.

e) Ácido protocatecuico

A melhor faixa de concentração para a determinação do CE_{50} do ácido protocatecuico variou de 3,55 μM a 17,75 μM . A Figura 30 mostra os gráficos gerados a partir dos três ensaios realizados com o ácido protocatecuico e seus valores de CE_{50} calculados.

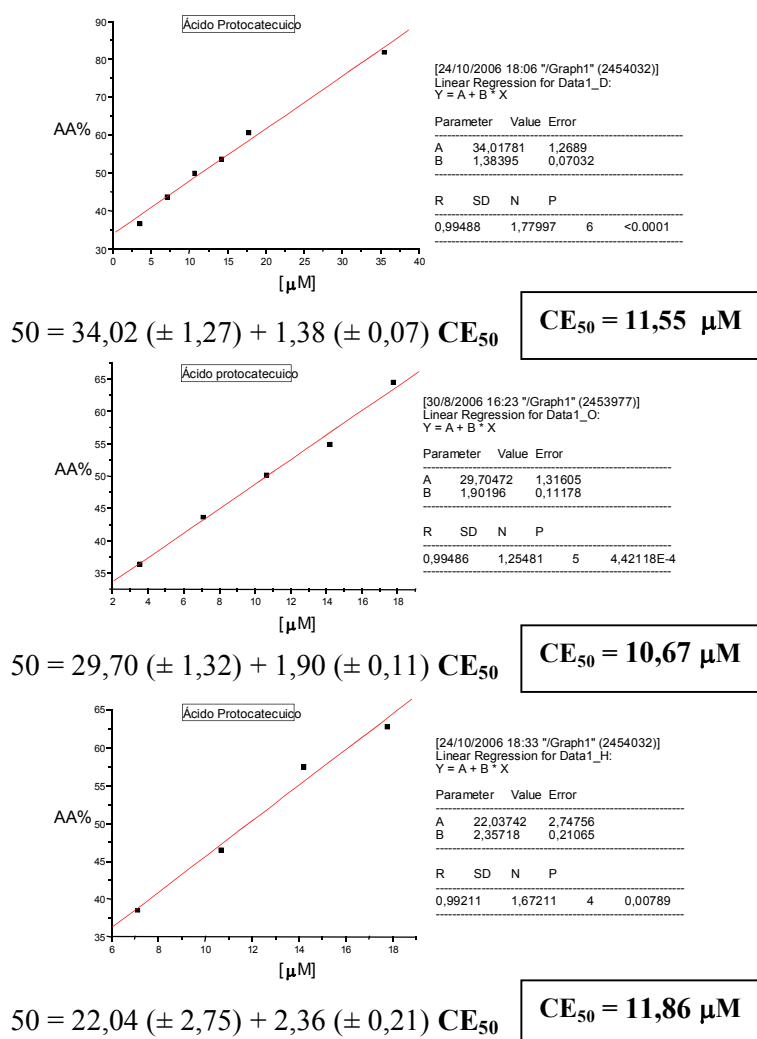


Figura 30. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do **ácido protocatecuico**, equações das retas e os seus valores de CE_{50} calculados para os três ensaios da triplicata.

Os três valores de CE_{50} do ácido protocatecuico foram reunidos na Tabela 13, p. 53, bem como suas médias e desvios padrão, juntamente com os resultados dos outros padrões.

Os valores das médias são apresentados repetidamente na Tabela 18, p. 74 para fins de discussão.

f) *Ácido para-cumárico*

A faixa de concentração avaliada para a determinação do CE₅₀ do ácido *para-cumárico* variou de 0,07 µM a 71,00 µM. A atividade antioxidante deste padrão não apresentou bom resultado para os três ensaios (Quadro 4), indicando que este ácido não agiu como um bom sequestrador do radical DPPH.

1º ENSAIO		controle				média	% AA
		0,2	0,215	0,201	0,198	0,2035	
[diluções]	[microplaca]		amostra 1			média	
100 µM	71 µM	C	0,213	0,208	0,203	0,208	16,13
50 µM	35,5 µM	D	0,221	0,224	0,218	0,221	9,91
25 µM	17,75 µM	E	0,224	0,212	0,211	0,2157	13,68
10 µM	7,1 µM	F	0,22	0,226	0,207	0,2177	10,40
1 µM	0,71 µM	G	0,23	0,233	0,212	0,225	9,75
0,1 µM	0,07 µM	H	0,208	0,206	0,206	0,2067	16,46
			branco 1				
100 µM	71 µM	C	0,036	0,036	0,04	0,0373	
50 µM	35,5 µM	D	0,036	0,037	0,04	0,0377	
25 µM	17,75 µM	E	0,038	0,04	0,042	0,04	
10 µM	7,1 µM	F	0,035	0,035	0,036	0,0353	
1 µM	0,71 µM	G	0,038	0,038	0,048	0,0413	
0,1 µM	0,07 µM	H	0,037	0,037	0,036	0,0367	
2º ENSAIO		controle				média	% AA
		0,191	0,213	0,2	0,187	0,1978	
[diluções]	[microplaca]		amostra 2			média	
100 µM	71 µM	C	0,217	0,235	0,209	0,2203	7,46
50 µM	35,5 µM	D	0,205	0,229	0,215	0,2163	8,47
25 µM	17,75 µM	E	0,178	0,201	0,21	0,1963	20,27
10 µM	7,1 µM	F	0,214	0,229	0,225	0,2227	5,77
1 µM	0,71 µM	G	0,201	0,217	0,221	0,213	12,68
0,1 µM	0,07 µM	H	0,217	0,213	0,222	0,2173	9,14
			branco 2				
100 µM	71 µM	C	0,037	0,038	0,037	0,0373	
50 µM	35,5 µM	D	0,035	0,035	0,036	0,0353	
25 µM	17,75 µM	E	0,038	0,039	0,039	0,0387	
10 µM	7,1 µM	F	0,037	0,036	0,036	0,0363	
1 µM	0,71 µM	G	0,04	0,041	0,04	0,0403	
0,1 µM	0,07 µM	H	0,037	0,038	0,038	0,0377	
3º ENSAIO		controle				média	% AA
		0,191	0,213	0,2	0,187	0,1978	
[diluções]	[microplaca]		amostra 3			média	
100 µM	71 µM	C	0,211	0,213	0,203	0,209	13,19
50 µM	35,5 µM	D	0,224	0,22	0,217	0,2203	6,11
25 µM	17,75 µM	E	0,211	0,215	0,21	0,212	11,84
10 µM	7,1 µM	F	0,226	0,214	0,211	0,217	8,64
1 µM	0,71 µM	G	0,228	0,217	0,217	0,2207	8,13
0,1 µM	0,07 µM	H	0,209	0,205	0,213	0,209	13,86
			branco 3				
100 µM	71 µM	C	0,038	0,04	0,034	0,0373	
50 µM	35,5 µM	D	0,035	0,036	0,033	0,0347	
25 µM	17,75 µM	E	0,039	0,036	0,038	0,0377	
10 µM	7,1 µM	F	0,036	0,036	0,037	0,0363	
1 µM	0,71 µM	G	0,037	0,038	0,042	0,039	
0,1 µM	0,07 µM	H	0,036	0,038	0,042	0,0387	

Quadro 4. Esquema das leituras (absorvâncias) das amostras de *ácido para-cumárico* nas microplacas, as concentrações e valores de % AA nos três ensaios.

Os resultados apresentados nas Tabelas 18 referem-se às médias dos ensaios realizados para cada padrão em μM e, também convertidos em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para serem comparados aos extratos e aos méis.

Tabela 18. Valores das médias dos CE_{50} (μM e $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) obtidos para os padrões das substâncias fenólicas nos ensaios de atividade antioxidante pelo método do DPPH.

Padrões	Média Atividade Antioxidante (CE_{50})	Média Atividade Antioxidante (CE_{50})
	[μM]	[$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]
Quercetina	3,17	0,96
Morina	16,34	4,94
Rutina	8,52	5,20
Ác. Gálico	5,61	0,86
Ác. Protocatecuico	11,36	1,75

Os padrões de ácido gálico e quercetina demonstraram ser significativamente mais ativos que os demais. A partir dos valores obtidos para as atividades antioxidantes pelo método do DPPH para os padrões analisados, foi possível observar que tais resultados acompanharam as previsões teóricas discutidas previamente no início deste item (páginas 61-62). Essas avaliações são importantes, visto que, dificilmente encontra-se na literatura essa discussão aqui apresentada, bem como não há ainda uma padronização desses ensaios com méis e seus extratos, nem tampouco com os padrões das substâncias fenólicas.

7.2.2 – Avaliação da atividade antioxidante dos extratos dos méis

Conforme citado foram selecionados extratos de amostras (ricos em substâncias fenólicas) estudadas anteriormente (LIANDA, 2004) para avaliação antioxidante, bem como foram incluídos dois extratos preparados posteriormente, sendo quatro méis silvestres de origem provável da Mata Atlântica (**RLS10-éter**, **RLS12-éter**, **RLS21-acet** e **RLS23-éter**) e cinco méis de laranja (**RLL03-éter**, **RLL15-acet**, **RLL16-acet**, **RLL18-éter** e **RLL19-acet**, Tabelas 7 e 8, p. 44 e 45).

As soluções-estoque dos extratos (em metanol) foram preparadas na concentração de $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), e foram realizados três ensaios independentes (em triplicata), seguindo a mesma metodologia utilizada para os padrões. Aqui serão demonstrados somente os resultados definitivos, não considerando aqueles que indicam a melhor faixa de concentração efetiva. Primeiramente serão citados os extratos de méis silvestres e posteriormente os de laranja.

- **Méis Silvestres:**

a) Extrato do mel RLS10-éter

A melhor concentração para a CE_{50} do extrato do mel **RLS10** encontrou-se entre 0,07 e 10,65 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A Figura 31 mostra os gráficos gerados a partir dos três ensaios realizados e seus valores de CE_{50} calculados.

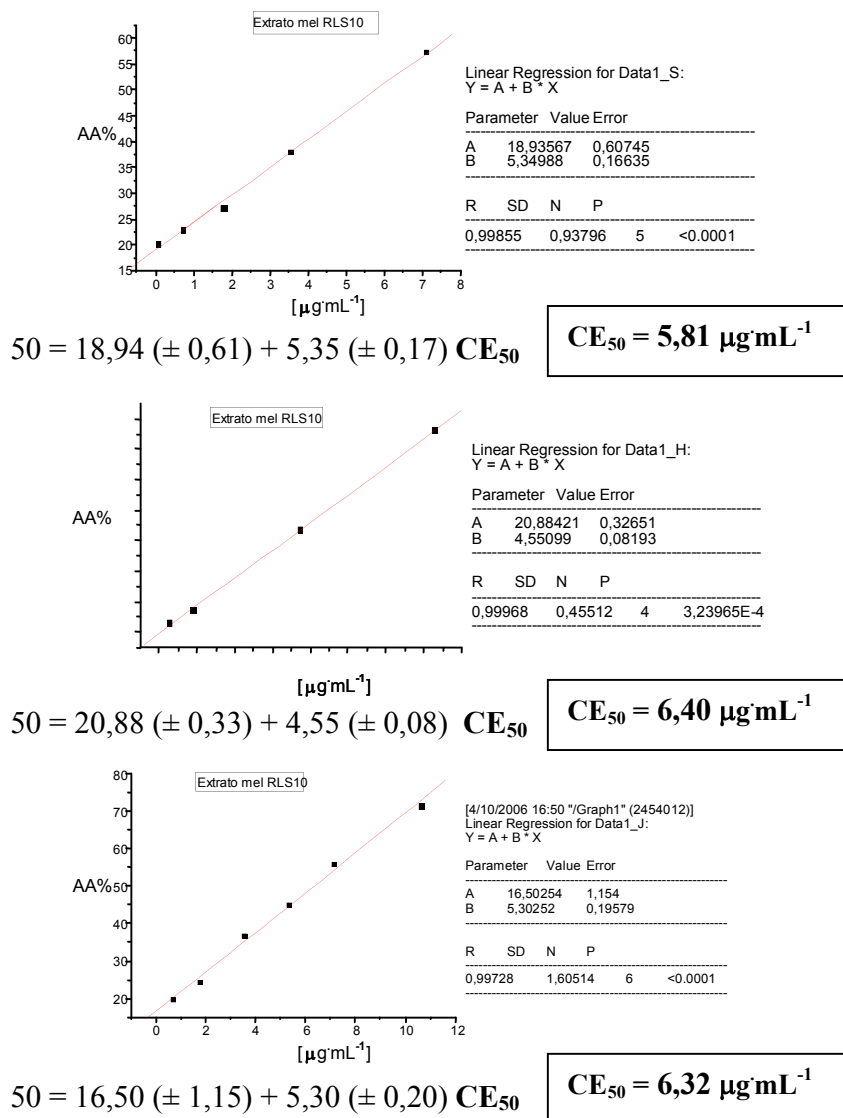
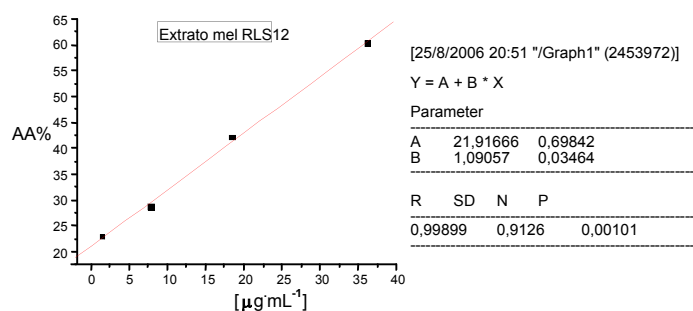


Figura 31. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do **extrato RLS10**, equações das retas e os seus valores de CE_{50} calculados para os três ensaios da triplicata.

Os três valores de CE_{50} de cada extrato foram reunidos na Tabela 14, p. 54, sendo calculadas as médias e indicados os desvios padrão. Os valores das médias são apresentados repetidamente na Tabela 19, p. 84 para fins de discussão.

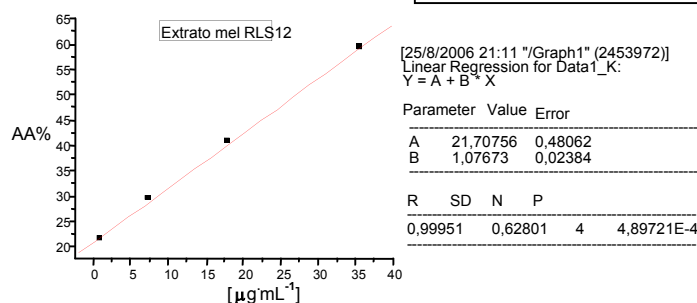
b) Extrato do mel RLS12-éter

A melhor faixa de concentração para a determinação do valor de CE_{50} do extrato do mel **RLS12** variou de 3,55 a 53,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A Figura 32 mostra os gráficos gerados a partir dos três ensaios realizados e seus valores de CE_{50} calculados.



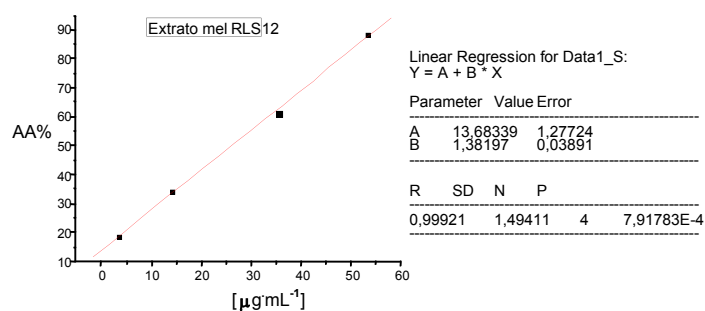
$$50 = 21,92 (\pm 0,70) + 1,09 (\pm 0,03) CE_{50}$$

$$CE_{50} = 25,75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$$



$$50 = 21,71 (\pm 0,48) + 1,08 (\pm 0,02) CE_{50}$$

$$CE_{50} = 26,28 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$$



$$50 = 13,68 (\pm 1,28) + 1,38 (\pm 0,04) CE_{50}$$

$$CE_{50} = 26,28 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$$

Figura 32. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do **extrato RLS12**, equações das retas e os seus valores de CE_{50} calculados para os três ensaios da triplicata.

c) Extrato do mel RLS21-acet

A melhor faixa de concentração para a determinação do valor de CE_{50} do extrato do mel **RLS21** variou de 3,55 a 71,00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A Figura 33 mostra os gráficos gerados a partir dos três ensaios realizados e seus valores de CE_{50} calculados.

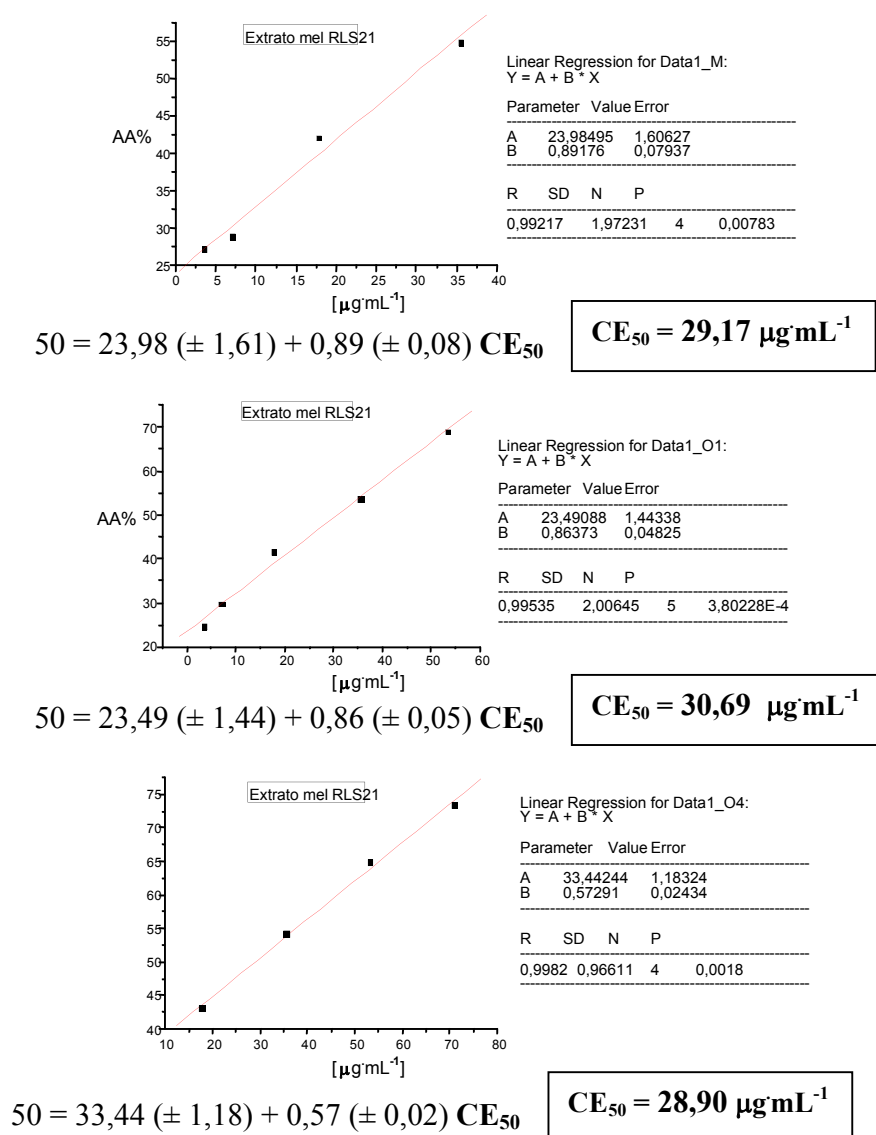


Figura 33. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do **extrato RLS21**, equações das retas e os seus valores de CE_{50} calculados para os três ensaios da triplicata.

d) Extrato do mel RLS23-éter

A melhor faixa de concentração para a determinação do valor de CE_{50} do extrato do mel **RLS23** variou de 3,55 a 53,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A Figura 34 mostra os gráficos gerados a partir dos três ensaios realizados e seus valores de CE_{50} calculados.

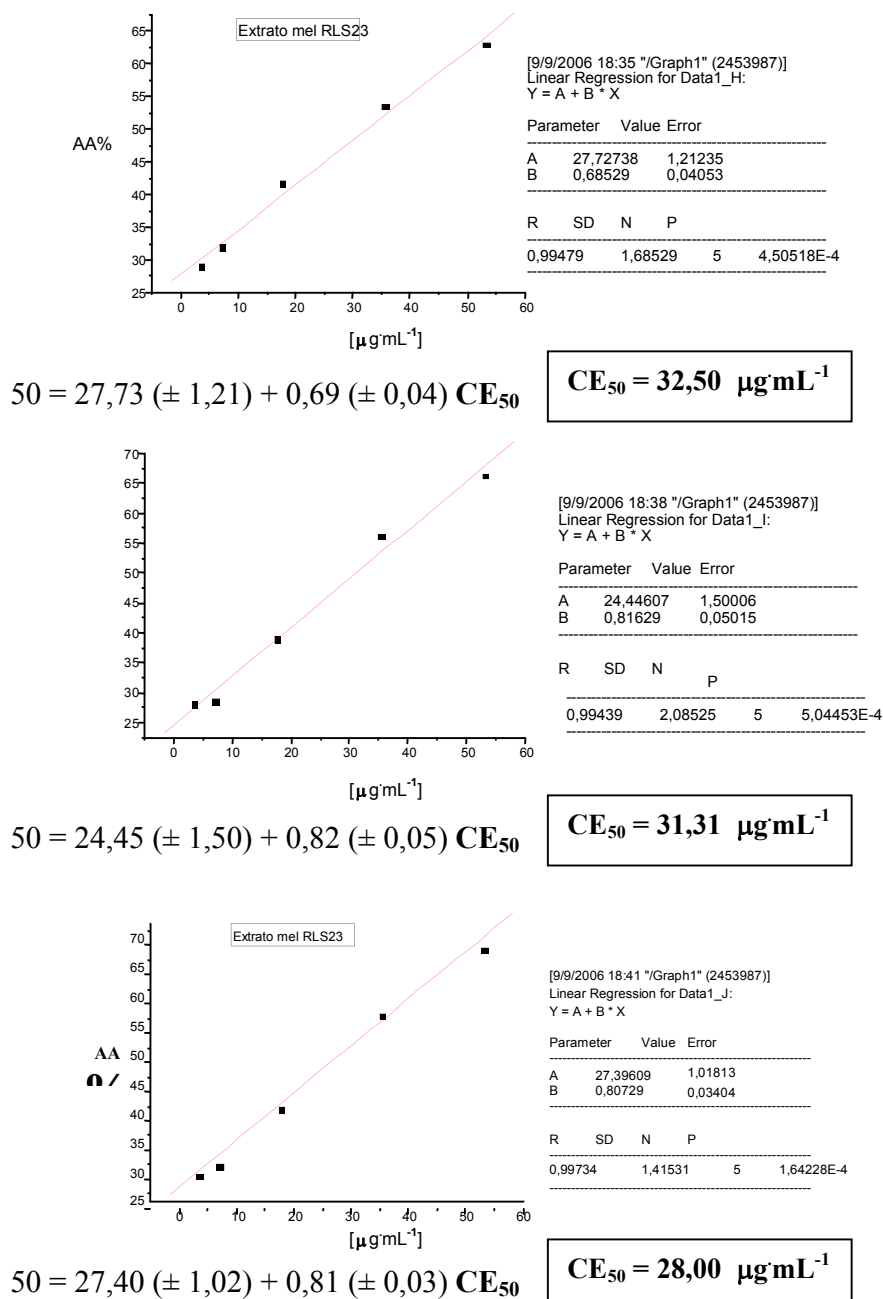


Figura 34. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do **extrato RLS23**, equações das retas e os seus valores de CE_{50} calculados para os três ensaios da triplicata.

e) Extrato do mel RLL03-éter

A melhor faixa de concentração para determinação do valor de CE_{50} do extrato do mel **RLL03** variou de 15,98 a 85,20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A Figura 35 mostra os gráficos gerados a partir dos três ensaios realizados e seus valores de CE_{50} calculados.

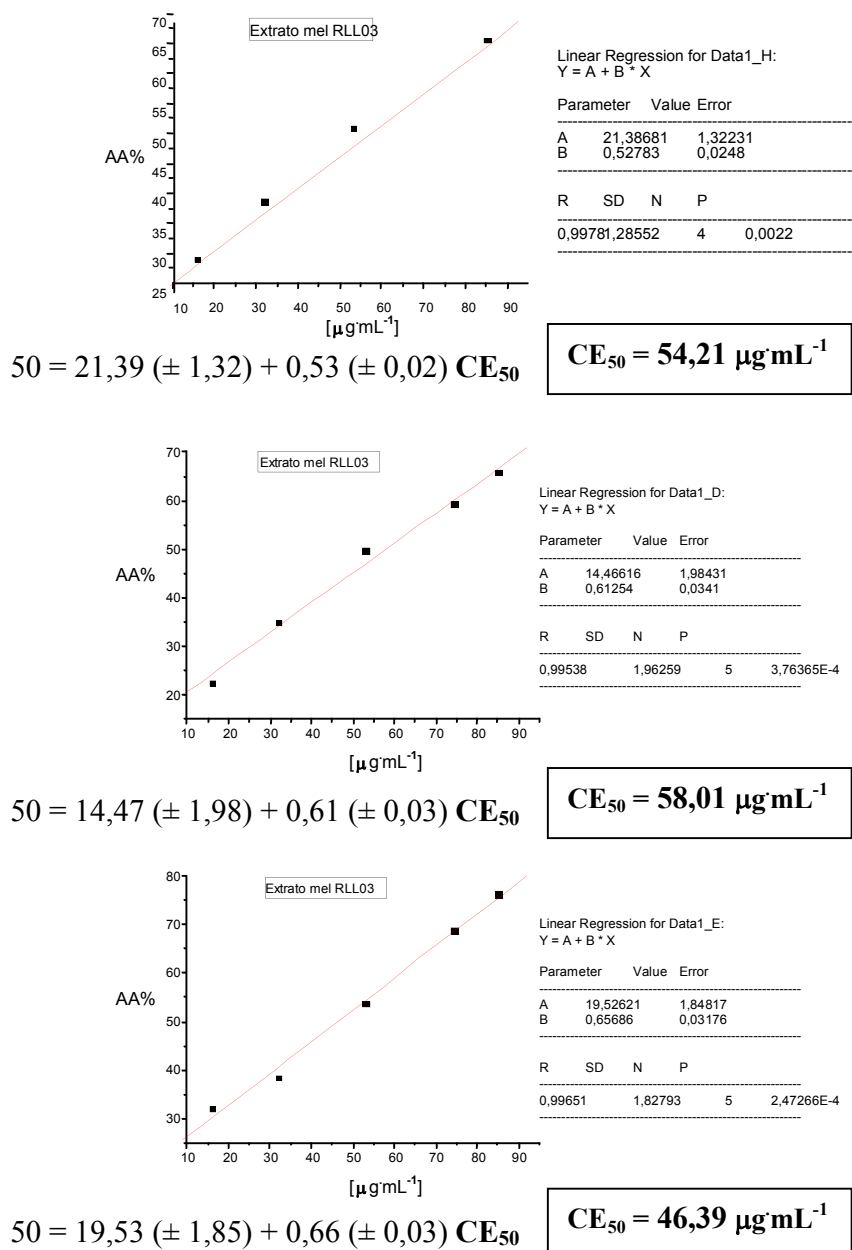


Figura 35. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do **extrato RLL03**, equações das retas e os seus valores de CE_{50} calculados para os três ensaios da triplicata.

f) Extrato do mel RLL15-acet

A melhor faixa de concentração para a determinação do valor de CE_{50} do extrato do mel **RLL15** variou de 3,55 a 35,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A Figura 36 mostra os gráficos gerados a partir dos três ensaios realizados e seus valores de CE_{50} calculados.

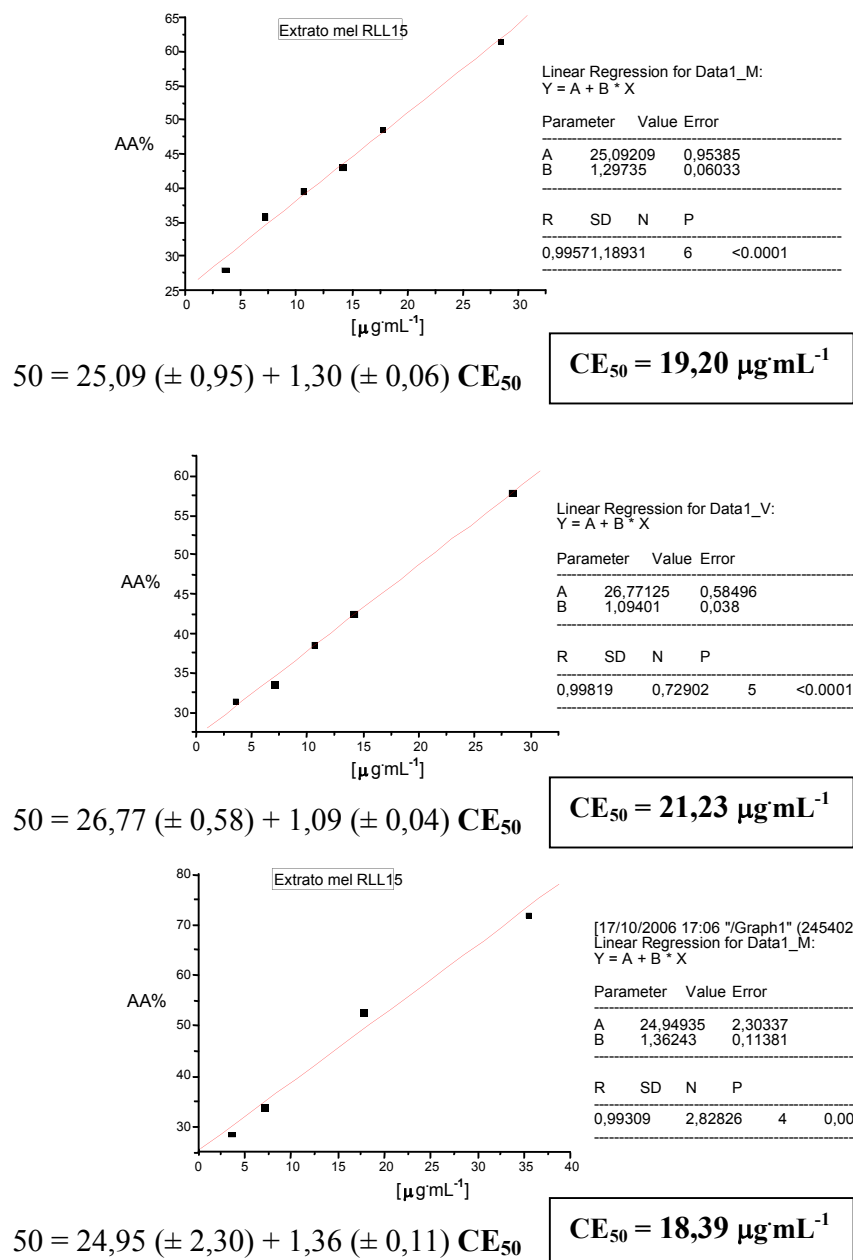
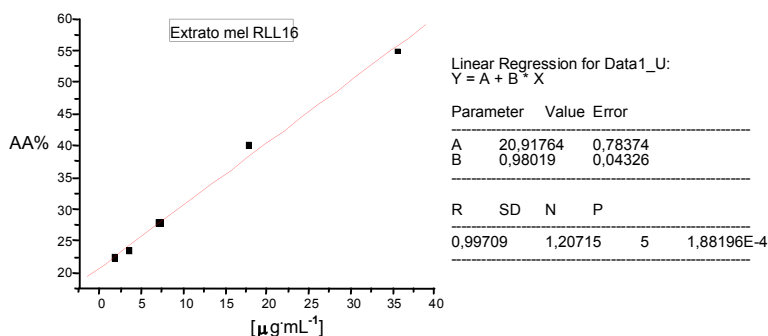


Figura 36. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do **extrato RLL15**, equações das retas e os seus valores de CE_{50} calculados para os três ensaios da triplicata.

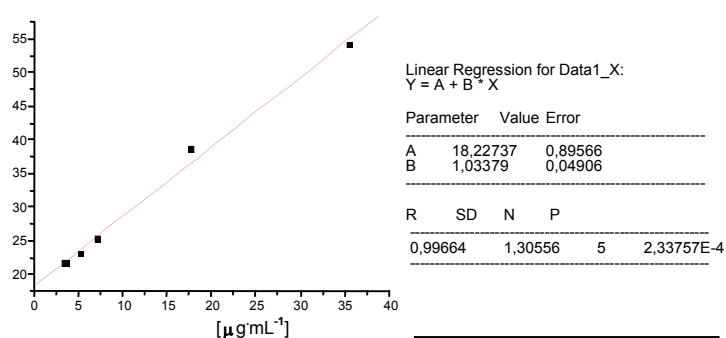
g) Extrato do mel RLL16-acet

A melhor faixa de concentração para a determinação do valor de CE_{50} do extrato do mel **RLL16** variou de 1,78 a 35,50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A Figura 37 mostra os gráficos gerados a partir dos três ensaios realizados e seus valores de CE_{50} calculados.



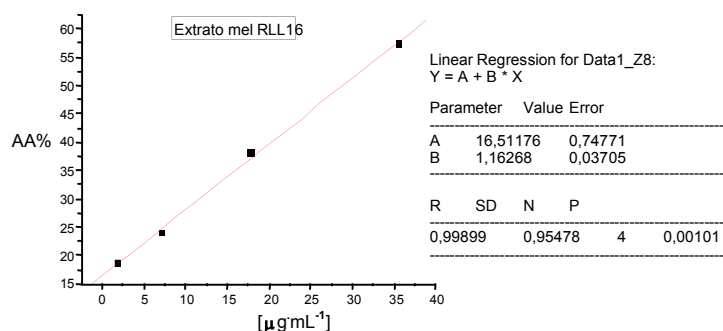
$$50 = 20,92 (\pm 0,78) + 0,98 (\pm 0,04) CE_{50}$$

$$CE_{50} = 29,67 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$$



$$50 = 18,23 (\pm 0,90) + 1,03 (\pm 0,05) CE_{50}$$

$$CE_{50} = 30,73 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$$



$$50 = 16,52 (\pm 0,75) + 1,16 (\pm 0,04) CE_{50}$$

$$CE_{50} = 28,80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$$

Figura 37. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do **extrato RLL16**, equações das retas e os seus valores de CE_{50} calculados para os três ensaios da triplicata.

h) Extrato do mel RLL18-éter

A melhor faixa de concentração para a determinação do valor de CE_{50} do extrato do mel **RLL18** variou de 3,55 a 35,50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A Figura 38 mostra os gráficos gerados a partir dos três ensaios realizados e seus valores de CE_{50} calculados.

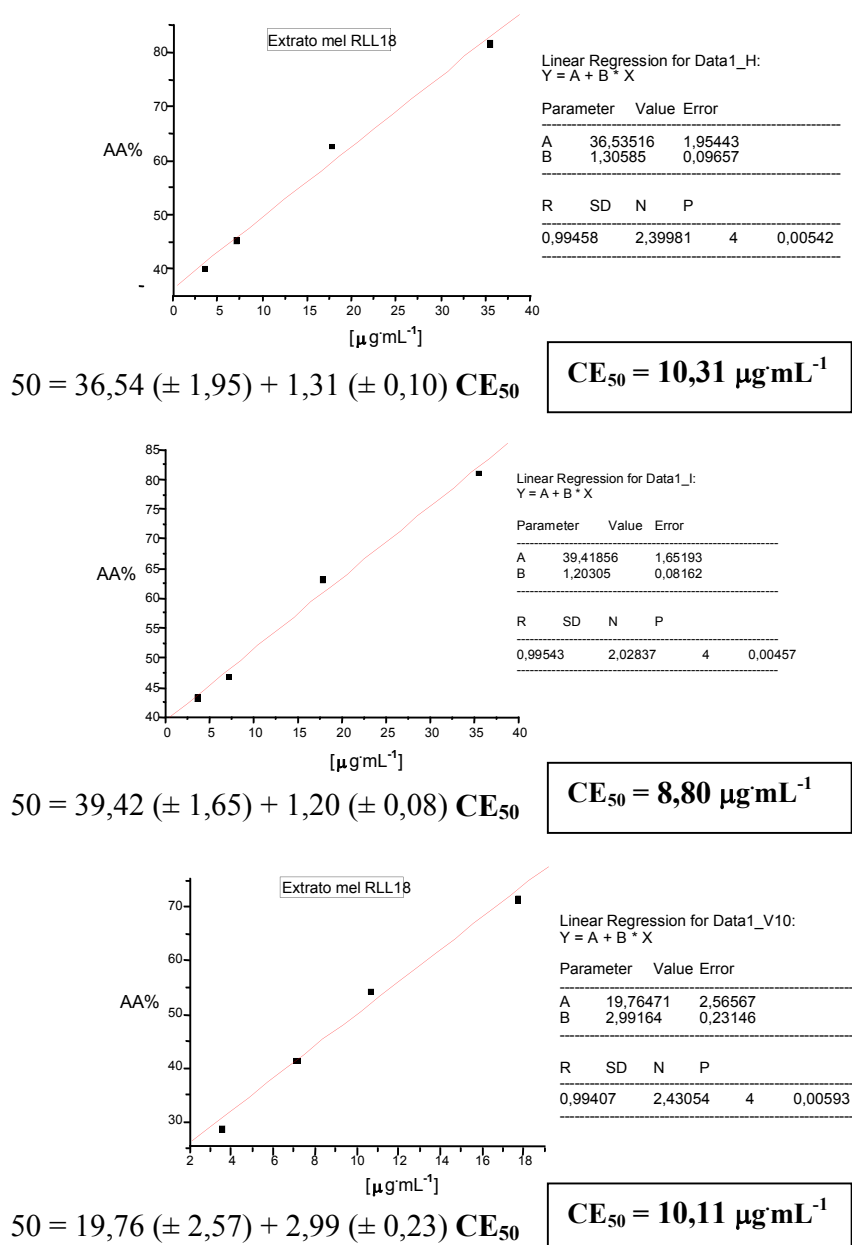
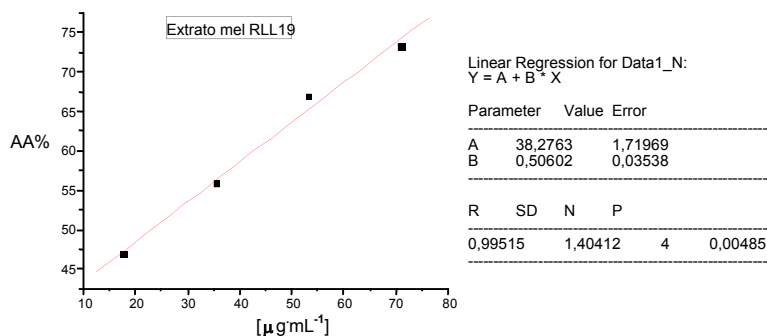


Figura 38. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do **extrato RLL18**, equações das retas e os seus valores de CE_{50} calculados para os três ensaios da triplicata.

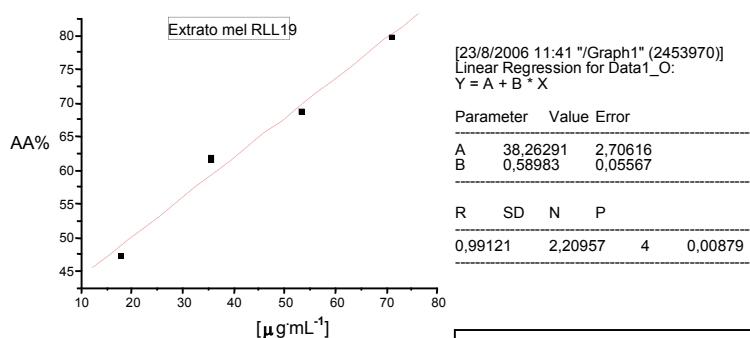
i) Extrato do mel RLL19-acet

A melhor faixa de concentração para a determinação do valor de CE_{50} do extrato do mel **RLL19** variou de 17,75 a 71,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A Figura 39 mostra os gráficos gerados a partir dos três ensaios realizados e seus valores de CE_{50} calculados.



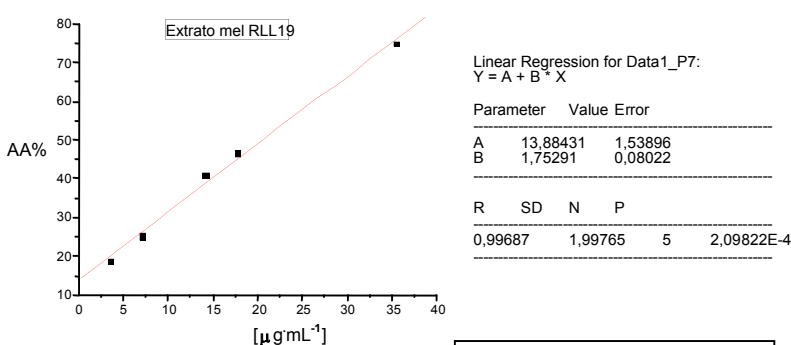
$$50 = 38,28 (\pm 1,72) + 0,51 (\pm 0,04) CE_{50}$$

$$CE_{50} = 23,17 \mu\text{g mL}^{-1}$$



$$50 = 38,26 (\pm 2,71) + 0,59 (\pm 0,06) CE_{50}$$

$$CE_{50} = 19,90 \mu\text{g mL}^{-1}$$



$$50 = 13,88 (\pm 1,54) + 1,75 (\pm 0,08) CE_{50}$$

$$CE_{50} = 20,60 \mu\text{g mL}^{-1}$$

Figura 39. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do **extrato RLL19**, equações das retas e os seus valores de CE_{50} calculados para os três ensaios da triplicata.

Os resultados apresentados na Tabela 19 referem-se às médias dos ensaios realizados para cada extrato em $\mu\text{g mL}^{-1}$, podendo ser comparados aos valores encontrados para as substâncias padrões (Tabela 18, p. 74).

Tabela 19. Valores das médias de CE_{50} obtidos para os extratos de méis nos ensaios de atividade antioxidante pelo método do DPPH.

Amostras – EXTRATOS	Média Atividade Antioxidante (CE_{50}) [$\mu\text{g mL}^{-1}$]
Méis silvestres	
RLS10-éter	6,17
RLS12-éter	26,10
RLS21-acet	29,59
RLS23-éter	30,60
Méis de laranjeira	
RLL03-éter	52,87
RLL15-acet	19,61
RLL16-acet	29,74
RLL18-éter	9,74
RLL19-acet	21,22

Os extratos das amostras avaliadas (**RLS10, RLS12, RLL03, RLL15, RLL16, RLL18, RLL19**), cujos perfis cromatográficos foram estudadas anteriormente (LIANDA, 2004), indicaram a presença dos seguintes ácidos fenólicos: ácido cinâmico, ácido *para*-cumárico, ácido sinápico e *para*-metoxicinâmico; ácido *para*-hidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido sirínico, ácido protocatecuico e ácido gálico; além dos flavonóides: quercetina, morina e rutina em pequena proporção.

Os expressivo resultados obtidos para a atividade antioxidante dos extratos dos méis podem estar relacionados a teor de substâncias fenólicas presentes nesses méis. Os valores obtidos para a atividade antioxidante dos extratos dos méis, quando comparados aos valores obtidos para os padrões (Tabela 18, p. 74), podem estar relacionados as substâncias fenólicas que foram identificadas por CLAE-DAD, sugerindo assim, quais dessas substâncias são as responsáveis por tal atividade em cada amostra.

Observando-se as estruturas dos ácidos fenólicos identificados nos diversos extratos (Figura 3, p. 9 e figura 5, p. 10), apenas os ácidos protocatecuico e gálico podem formar *orto*-quinona, e assim estabilizarem o radical gerado após doarem seu hidrogênio radicalar ao DPPH, e desta forma apresentar maior atividade. Os demais ácidos que não têm hidroxilas vizinhas não podem formar a *orto*-quinona, supondo-se, então, apresentarem menor atividade.

Para o mel silvestre, o extrato **RLS10** foi o que apresentou a melhor atividade antioxidante ($6,17 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), podendo até ser comparado a uma substância padrão, principalmente a rutina ($5,20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Tabela 18, p. 74); e este extrato apresentou pela análise de CLAE-DAD, o ácido gálico, como a substância majoritária, e a morina em pequena proporção (área relativa) (LIANDA, 2004).

Os demais extratos dos méis silvestres (**RLS12**, **RLS21**, **RLS23**) apresentaram resultados muito inferiores ao **RLS10**, e não apresentaram em seus perfis cromatográficos a presença do ácido gálico ou de qualquer substância fenólica capaz de gerar *orto*-quinonas com facilidade, e assim, apresentar atividade seqüestradora de radical livre.

Entre os extratos dos méis de laranja também foi possível fazer a mesma correlação. O extrato **RLL03** ($52,87 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) apresentou baixa atividade seqüestradora do radical DPPH, provavelmente por apresentar em sua composição os ácidos *para*-cumárico, *para*-hidroxibenzóico (ambos com apenas uma hidroxila) e o ácido vanílico (hidroxila vizinha de metoxila), além de não apresentarem flavonóides. O extrato de mel de laranja que apresentou o melhor resultado para a atividade antioxidante foi o **RLL18** ($9,74 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), que continha em seu perfil cromatográfico ácido protocatecuico como constituinte majoritário. Os extratos **RLL16** e **RLL19** que apresentaram valores de CE_{50} inferiores ($29,74$ e $21,22 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente), também apresentaram o ácido gálico, porém em pequenas proporções (LIANDA, 2004).

A partir desses resultados foi possível observar uma correlação direta com a presença dos ácidos gálico, ácido protocatecuico e da morina, identificados nos perfis cromatográficos dos extratos **RLS10** e **RLL18**, que tiveram os melhores valores de CE_{50} quando comparados aos padrões comerciais (Tabela 18, p. 74).

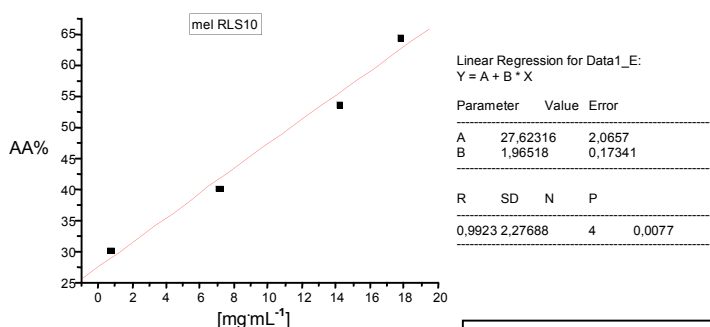
7.2.3 – Avaliação da atividade antioxidante dos méis

Assim como foi apresentado para os extratos, primeiramente serão citados os ensaios de méis silvestres e posteriormente os de laranja. Os resultados (as triplicatas de CE_{50}), as suas médias e os desvios padrão, foram reunidos na Tabela 15, p. 52. Os valores das médias são apresentados repetidamente na Tabela 20, p. 95 para fins de discussão.

A seguir estão apresentados os gráficos, equações e valores de CE_{50} para os três ensaios independentes de cada mel estudado.

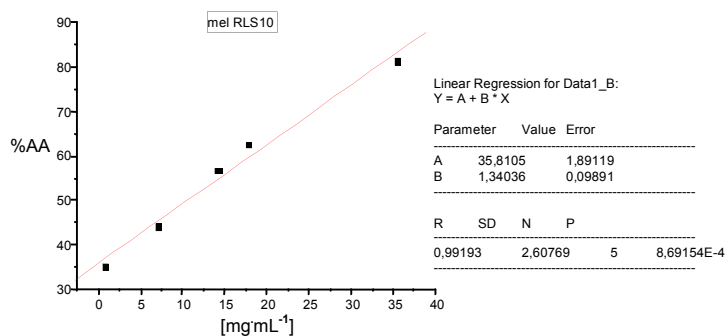
- Amostras de Méis Silvestres:

a) Mel RLS10



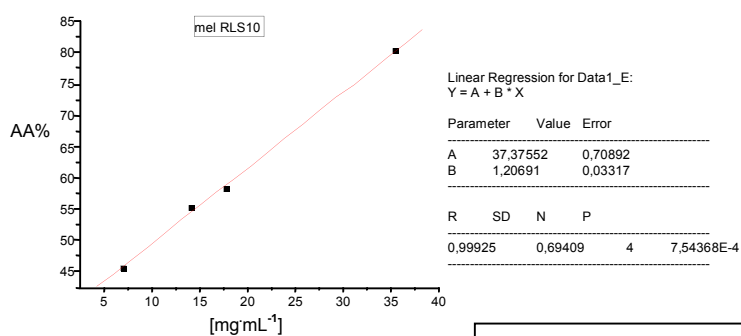
$$50 = 27,62 (\pm 2,07) + 1,97 (\pm 0,17) CE_{50}$$

$$CE_{50} = 11,39 \text{ mgmL}^{-1}$$



$$50 = 35,81 (\pm 1,89) + 1,34 (\pm 0,10) CE_{50}$$

$$CE_{50} = 10,59 \text{ mgmL}^{-1}$$



$$50 = 37,38 (\pm 0,71) + 1,21 (\pm 0,03) CE_{50}$$

$$CE_{50} = 10,46 \text{ mgmL}^{-1}$$

Figura 40. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do **mel RLS10**, equações das retas e os seus valores de CE_{50} calculados para os três ensaios da triplicata.

b) Mel RLS12

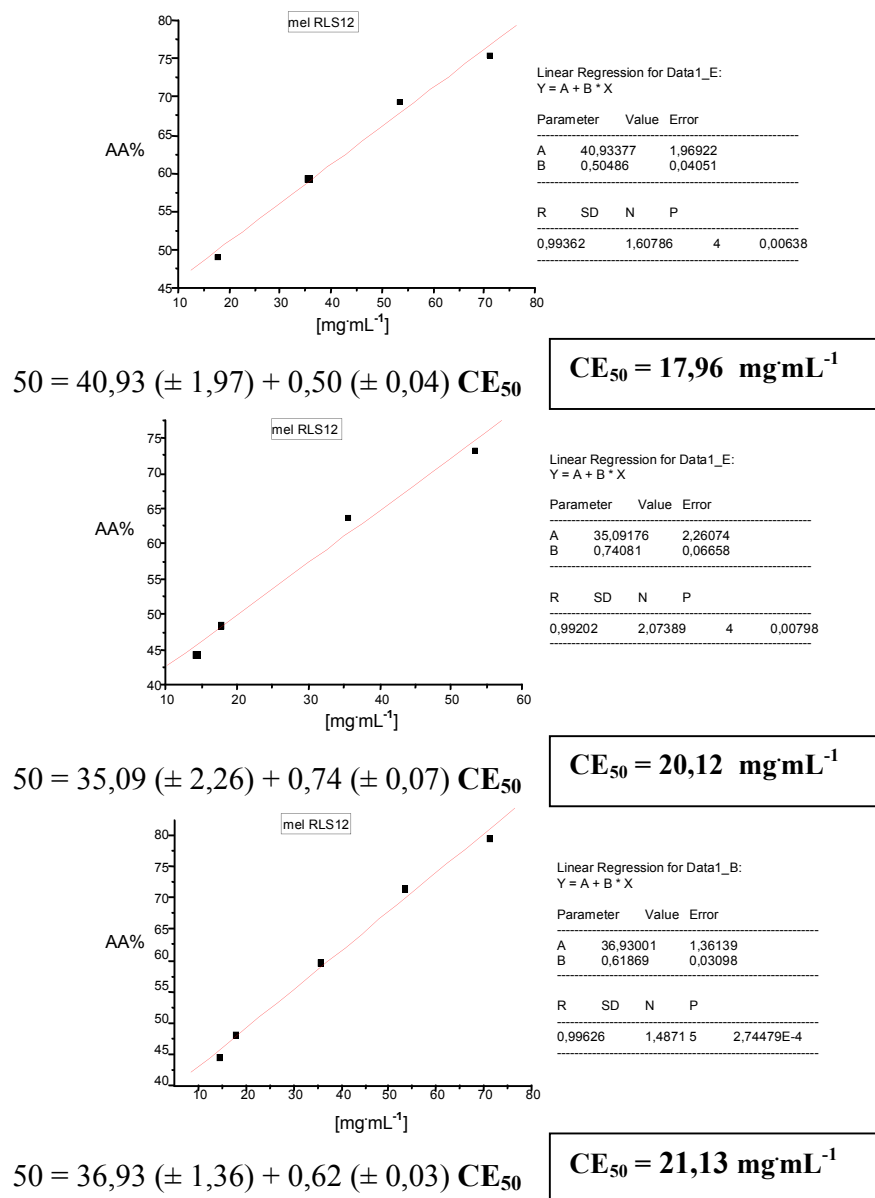
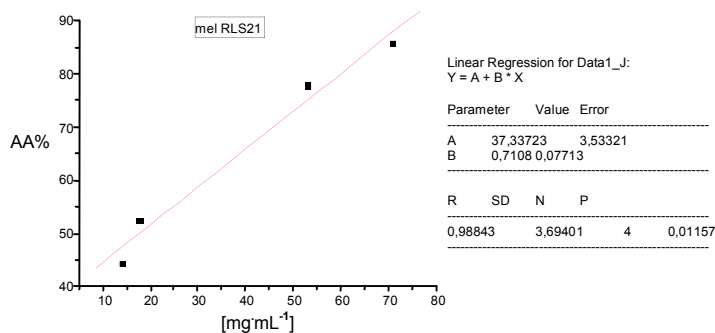


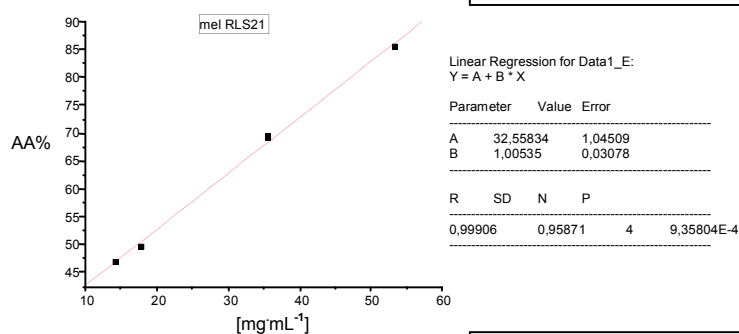
Figura 41. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do **mel RLS12**, equações das retas e os seus valores de CE_{50} calculados para os três ensaios da triplicata.

c) Mel RLS21



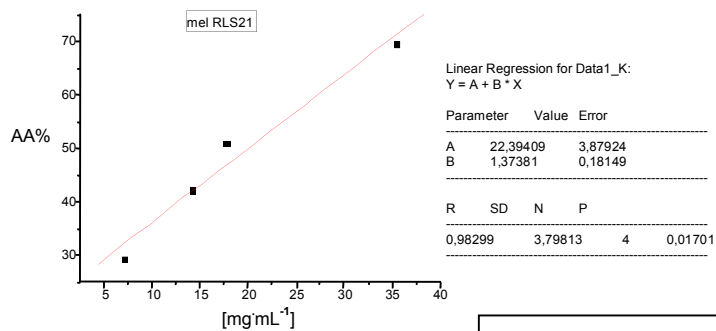
$$50 = 37,34 (\pm 3,53) + 0,71 (\pm 0,08) CE_{50}$$

$$CE_{50} = 17,82 \text{ mg·mL}^{-1}$$



$$50 = 32,56 (\pm 1,05) + 1,01 (\pm 0,03) CE_{50}$$

$$CE_{50} = 17,35 \text{ mg·mL}^{-1}$$



$$50 = 22,39 (\pm 3,88) + 1,37 (\pm 0,18) CE_{50}$$

$$CE_{50} = 20,09 \text{ mg·mL}^{-1}$$

Figura 42. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do **mel RLS21**, equações das retas e os seus valores de CE_{50} calculados para os três ensaios da triplicata.

d) Mel RLS23

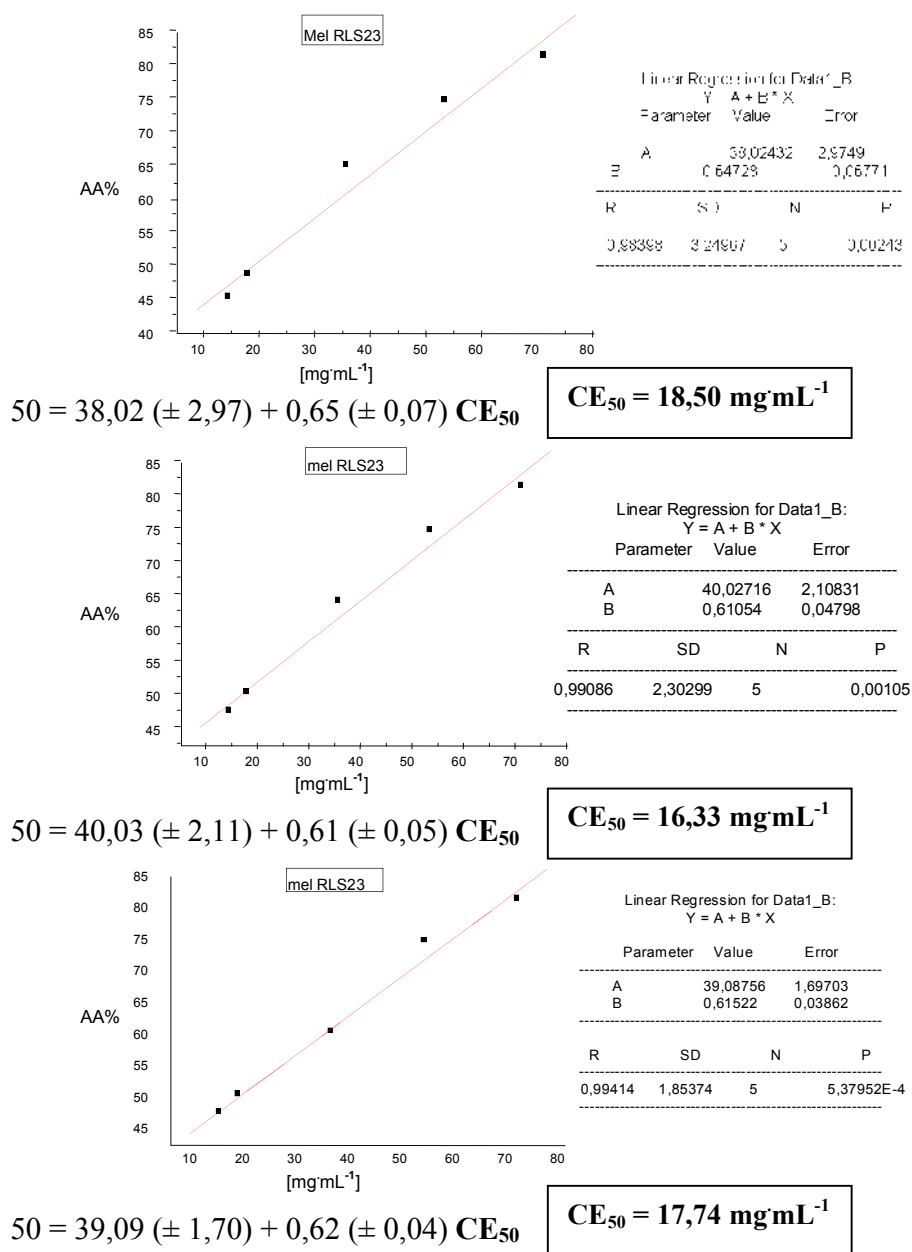


Figura 43. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do **mel RLS23**, equações das retas e os seus valores de CE_{50} calculados para os três ensaios da triplicata.

- Amostras de Méis Laranjeiras:

e) Mel RLL03

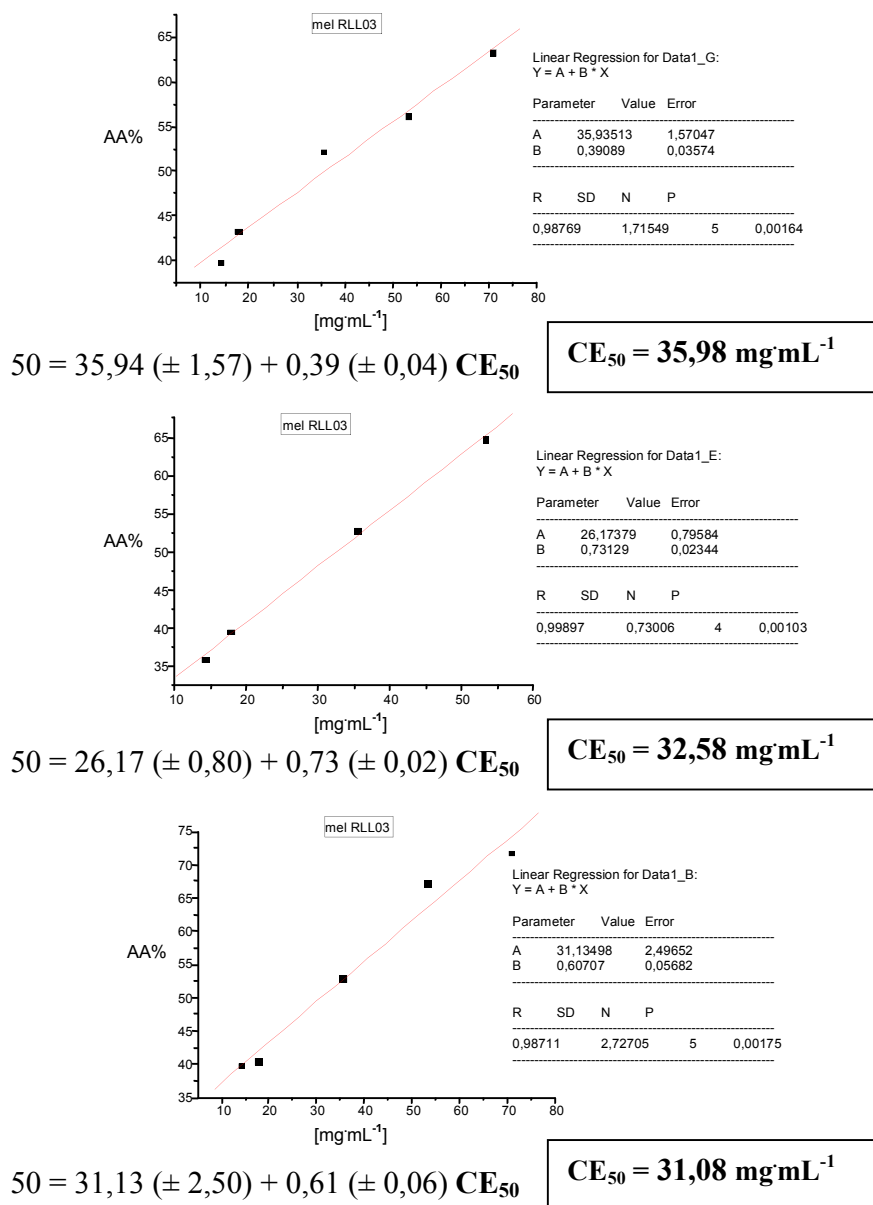


Figura 44. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do **mel RLL03**, equações das retas e os seus valores de CE_{50} calculados para os três ensaios da triplicata.

f) Mel RLL15

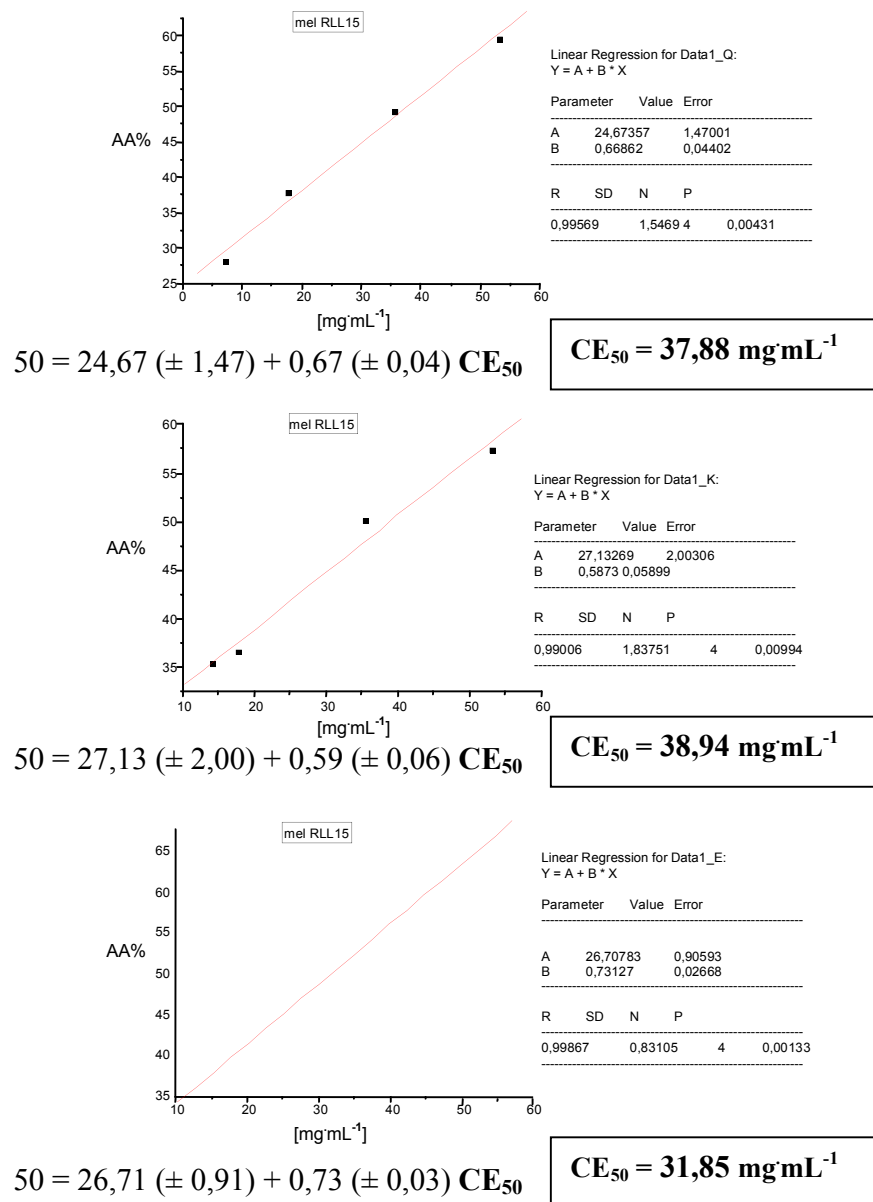
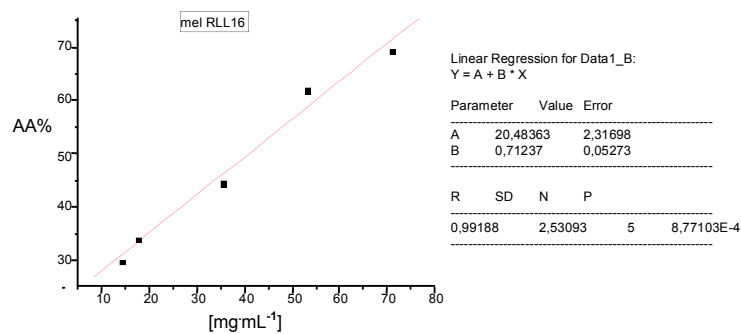


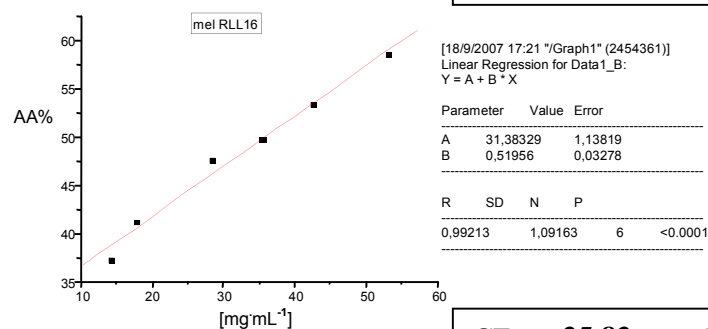
Figura 45. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do **mel RLL15**, equações das retas e os seus valores de CE₅₀ calculados para os três ensaios da triplicata.

g) Mel RLL16



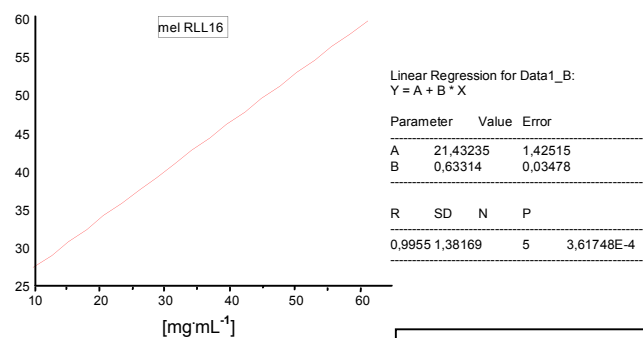
$$50 = 20,48 (\pm 2,32) + 0,71 (\pm 0,05) CE_{50}$$

$$CE_{50} = 41,43 \text{ mgmL}^{-1}$$



$$50 = 31,38 (\pm 1,14) + 0,52 (\pm 0,03) CE_{50}$$

$$CE_{50} = 35,83 \text{ mgmL}^{-1}$$



$$50 = 21,43 (\pm 1,43) + 0,63 (\pm 0,03) CE_{50}$$

$$CE_{50} = 45,12 \text{ mgmL}^{-1}$$

Figura 46. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do **mel RLL16**, equações das retas e os seus valores de CE_{50} calculados para os três ensaios da triplicata.

h) Mel RLL18

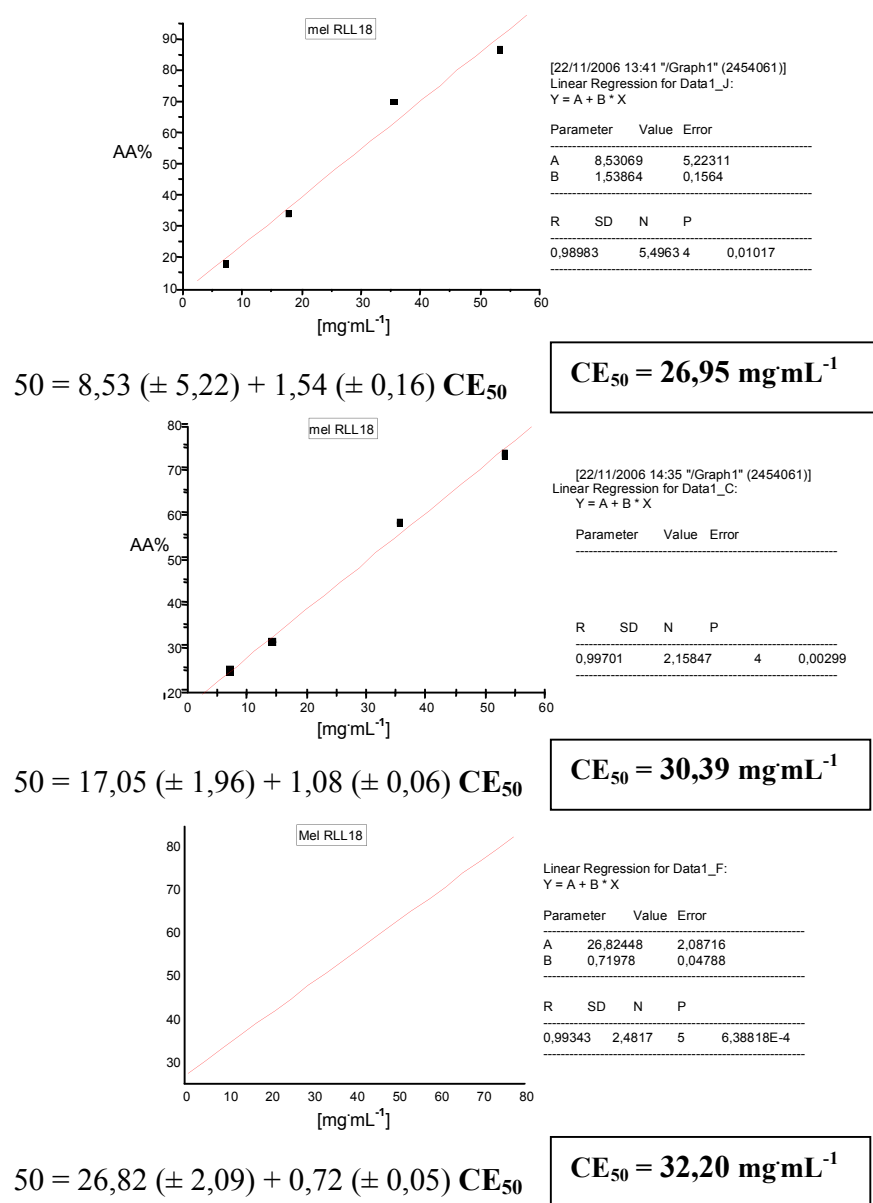


Figura 47. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do **mel RLL18**, equações das retas e os seus valores de CE_{50} calculados para os três ensaios da triplicata.

i) **Mel RLL19**

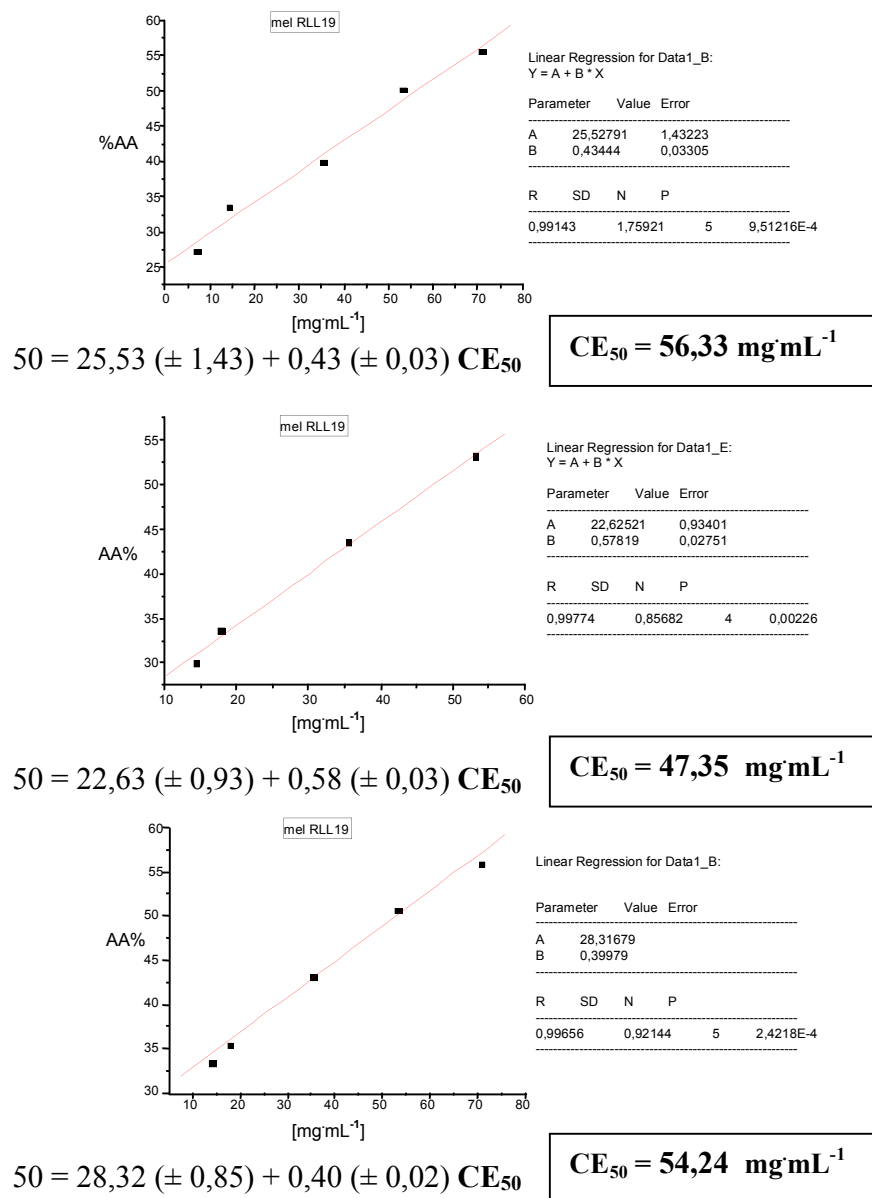


Figura 48. Gráficos que relacionam o percentual de atividade antioxidante e a concentração do **mel RLL19**, equações das retas e os seus valores de CE₅₀ calculados para os três ensaios da triplicata.

Os resultados apresentados na Tabela 20 referem-se às médias dos CE₅₀ dos ensaios realizados para cada mel em mg·mL⁻¹.

Tabela 20. Valores das médias de CE_{50} obtidos para os méis nos ensaios de atividade antioxidante pelo método do DPPH.

Amostras – MÉIS	Média Atividade Antioxidante (CE_{50}) [$mg \cdot mL^{-1} \pm DP$]
Méis silvestres	
RLS10	10,81 $\pm$ 0,50279
RLS12	19,74 $\pm$ 1,61882
RLS21	18,42 $\pm$ 1,46890
RLS23	17,52 $\pm$ 1,09953
Méis de laranjeira	
RLL03	33,21 $\pm$ 2,51332
RLL15	36,22 $\pm$ 3,82154
RLL16	40,80 $\pm$ 4,67728
RLL18	29,85 $\pm$ 2,66487
RLL19	52,64 $\pm$ 4,70035

Para facilitar a visualização da comparação dos resultados obtidos com os ensaios de atividade antioxidante dos extratos e dos méis, os valores de suas médias estão reunidos na Tabela 21 e, em seguida são discutidas as observações realizadas.

Tabela 21. Valores das médias dos CE_{50} obtidos dos extratos e dos méis nos ensaios de atividade antioxidante pelo método do DPPH, em $\mu g \cdot mL^{-1}$ e $mg \cdot mL^{-1}$, respectivamente.

AMOSTRAS	Média CE_{50} [$\mu g \cdot mL^{-1}$] - EXTRATOS	Média CE_{50} [$mg \cdot mL^{-1}$] - MÉIS
Méis silvestres		
RLS10	6,18	10,81
RLS12	26,10	19,74
RLS21	29,59	18,42
RLS23	30,60	17,52
Méis de laranjeira		
RLL03	52,87	33,21
RLL15	19,61	36,22
RLL16	29,74	40,80
RLL18	9,74	29,85
RLL19	21,22	52,64

Comparando-se os resultados dos ensaios de atividade antioxidante dos méis monoflorais com a de seus extratos, foi possível observar uma maior variação nos valores obtidos para os extratos e méis de laranjeira, onde os extratos se apresentaram mais ativos. Já para os méis heteroflorais foi observado que os valores obtidos para as amostras de méis silvestres foram mais ativos do que a dos seus extratos, exceto a amostra **RLS10** que apresentou o extrato como o mais ativo de todos ($6,17 \mu\text{g mL}^{-1}$). Apesar das diferenças observadas, ainda assim, os melhores resultados mantiveram-se tanto para os méis quanto para seus extratos para as amostras **RLS10** ($10,81 \text{ mg mL}^{-1}$ e $6,17 \mu\text{g mL}^{-1}$) e **RLL18** ($29,85 \text{ mg mL}^{-1}$ e $9,74 \mu\text{g mL}^{-1}$). Comparados aos padrões usados, esses extratos apresentaram atividades similares a rutina, com seus valores de CE_{50} próximos, principalmente o **RLS10**. De maneira geral os resultados demonstraram que os méis silvestres (provável origem da Mata Atlântica) apresentaram-se mais ativos do que os méis de laranjeira.

7.2.4 – Avaliação do teor de fenóis totais dos méis

Em paralelo aos ensaios de atividade antioxidante, os teores de fenóis totais dos méis foram quantificados através do método de Folin-Denis, utilizando o ácido gálico como padrão de referência (metodologia descrita na p.48), sendo a curva analítica traçada com as concentrações 0 – $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$ para a determinação indireta dos teores de fenóis totais dos méis.

Na Tabela 10, p. 49, estão apresentados os valores das diferentes concentrações obtidas da solução do padrão de ácido gálico, com suas absorvâncias (triplicata e média) nos ensaios de Folin-Denis, dados que geraram o gráfico apresentado na Figura 49.

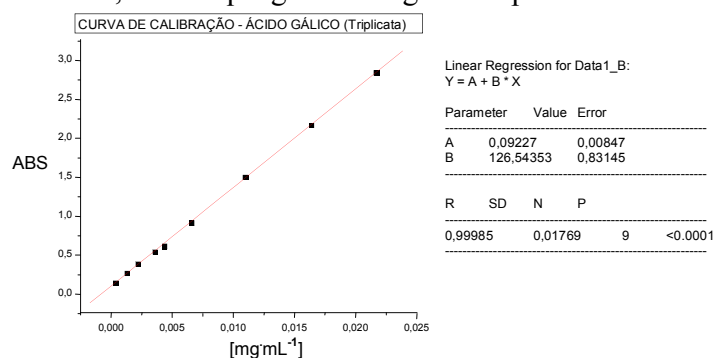


Figura 49. Curva analítica da relação entre as médias das concentrações da solução do ácido gálico e as absorvâncias (760 nm), nos ensaios de Folin-Denis.

A partir do gráfico obteve-se a reta dada pela equação:

$$Y = 0,09227 (\pm 0,00847) + 126,54353 (\pm 0,83145) X,$$

com $R = 0,99985$, $p < 0,0001$ e $n = 9$.

Os valores das absorvâncias (triplicata, suas médias e desvios padrão) obtidos nos ensaios de Folin-Denis das soluções de méis silvestres e de laranjeira estão apresentados na Tabela 9, p. 48.

Para o cálculo dos teores de fenóis totais de cada amostra, suas médias de absorvâncias foram substituídas na equação fornecida pelo gráfico representado acima, obtendo-se as respectivas concentrações (mg de ácido gálico·mL⁻¹), cujos valores foram convertidos em mg de ácido gálico/100 g de mel, conforme demonstrado abaixo, utilizando a amostra **RLS10** como exemplo.

$$Y = 0,09227 (\pm 0,00847) + 126,54353 (\pm 0,83145) X$$

$$1,082 = 0,09227 (\pm 0,00847) + 126,54353 (\pm 0,83145) X$$

$$X = 0,00782 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$$

Como o valor de 0,00782 mg (de ácido gálico) foi determinado por mL (de solução do ensaio), o cálculo deve considerar que para cada amostra foram utilizados 5,0 mL de solução do ensaio (0,5 mL da solução de mel + 2,5 mL do Reagente de Folin-Denis + 2,0 mL da solução de carbonato de sódio). Sendo assim, a massa de ácido gálico que corresponde a essa solução foi 0,0391 mg (ácido gálico). Considerando que nesse volume de 5,0 mL da solução do ensaio há 0,05 g de mel, concluiu-se que em 100 g desse mel havia **78,2 mg** de ácido gálico.

Os valores calculados para os teores de fenóis totais para cada amostra de mel foram reunidos na Tabela 22 abaixo.

Tabela 22. Resultados obtidos para teor de fenóis totais para as amostras de méis, através do Reagente de Folin-Denis.

Amostras – MÉIS [0,1 g·mL⁻¹]	Teor de Fenóis totais em equivalentes de ácido gálico (mg/100 g de mel)
Méis silvestres	
RLS10	78,2
RLS12	42,8
RLS21	57,2
RLS23	54,0
Méis de laranjeira	
RLL03	40,1
RLL15	35,7
RLL16	38,8
RLL18	53,2
RLL19	34,0

Os teores de compostos fenólicos totais nos méis variaram de 34,0 a 78,2 mg EAG/100g de mel. Assim como os resultados obtidos para o ensaio de DPPH, os méis heteroflorais (silvestre) apresentaram um teor de fenóis totais superior ao existente nos méis homoflorais (de laranjeira). É importante destacar que os méis **RLS10** (78,2 mg/100g de mel) e **RLL18** (53,2 mg/100 g de mel) foram os que apresentaram maiores quantidades de compostos fenólicos, mas tiveram uma diferença considerável entre os seus teores. Estes resultados corroboram com aqueles apresentados para as atividades antioxidantes, mostrando uma correlação positiva com o perfil fenólico encontrado. Os méis de laranjeira **RLL15**, **RLL16** e **RLL19**, oriundos da mesma cidade (Botucatu-SP), apresentaram muito semelhantes teores de compostos. Esta evidência pode ser justificada com base na semelhança das principais substâncias fenólicas (ácidos protocatecuico, *para*-cumárico e *para*-metoxi-cinâmico, por exemplo) identificadas em seus perfis cromatográficos por CLAE (Tabela 29, p.136; LIANDA, 2004), o que poderia corroborar por serem de mesma origem geográfica.

7.2.5 – Avaliação do teor de flavonóides totais dos méis

O teor de flavonóides totais também foi determinado para as amostras de méis, utilizando o ensaio com solução de cloreto de alumínio, segundo metodologia descrita nas p. 50.

O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonóides em metanol, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Dessa maneira, é possível determinar a quantidade de flavonóides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que quase sempre acompanham os flavonóides. Nessas condições, o complexo flavonóide-Al absorve em comprimento de onda bem maior do que o flavonóide sem a presença do agente complexante. Os ácidos fenólicos, mesmo os que formam complexos com $AlCl_3$, absorvem em comprimentos de onda muito inferiores, evitando-se dessa maneira interferências nas medidas de absorbância.

A curva analítica para a determinação indireta dos teores de flavonóides totais dos méis foi criada usando a quercetina ($0 - 0,025 \text{ mg mL}^{-1}$) como padrão. Na Tabela 12, p. 51, estão apresentados os valores das diferentes concentrações obtidas da solução do padrão de quercetina, com suas absorvâncias (triplicata e média) nos ensaios com cloreto de alumínio, dados que geraram o gráfico apresentado na Figura 50, dados que geraram o gráfico apresentado na Figura 50.

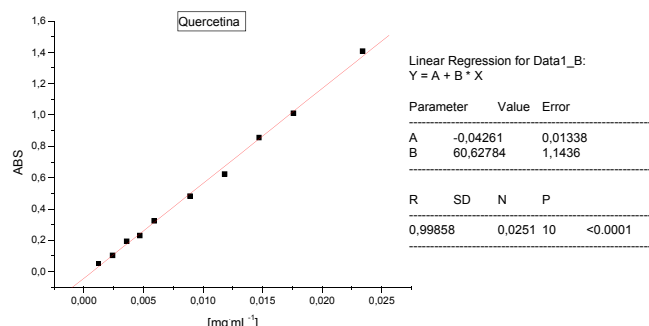


Figura 50. Curva analítica da relação entre as médias das concentrações da solução de quercetina e as absorvâncias (415 nm), nos ensaios com cloreto de alumínio.

A partir do gráfico obteve-se a equação da reta:

$$Y = -0,04261 (\pm 0,01338) + 60,62784 (\pm 1,1436) X,$$

com $R = 0,99858$, $p < 0,0001$ e $n = 10$.

As amostras de méis silvestres e de laranjeiras foram submetidas ao mesmo ensaio com cloreto de alumínio e os valores das absorvâncias (triplicata, suas médias e desvios padrão) estão apresentados na Tabela 11, p. 50.

Para o cálculo dos teores de flavonóides totais de cada amostra, as médias de suas absorvâncias foram substituídas na equação fornecida pelo gráfico representado acima (exceto os que apresentaram valores negativos), obtendo-se as respectivas concentrações (mg de quercetina·mL⁻¹). Os valores foram convertidos em mg de quercetina/100 g mel conforme demonstrado abaixo, utilizando a amostra **RLS23** como exemplo.

$$Y = -0,04261 (\pm 0,01338) + 60,62784 (\pm 1,1436) X$$

$$0,347 = -0,04261 (\pm 0,01338) + 60,62784 (\pm 1,1436) X$$

$$X = 0,0064 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$$

Foram encontrados 0,0064 mg (de quercetina) por mL (de solução do ensaio); como foram utilizados para cada amostra 6,0 mL de solução do ensaio (3,0 mL da solução de mel + 3,0 mL da solução de cloreto de alumínio), a massa de quercetina foi de 0,0384 mg. Considerando que nesse volume de 6,0 mL da solução do ensaio havia 0,9 g de mel, concluiu-se que em 100 g desse mel havia **4,27 mg** de quercetina.

Os valores calculados para os teores de flavonóides totais para cada amostra de mel estão reunidos na Tabela 23.

Tabela 23. Valores obtidos para teores de flavonóides totais para as amostras de méis usando cloreto de alumínio.

Amostras – MÉIS	Teor de Flavonóides totais em equivalentes de quercetina (mg/100 g de mel)
Méis silvestres	
RLS10	0,00
RLS12	0,25
RLS21	1,6
RLS23	4,27
Méis de laranjeira	
RLL03	0,00
RLL15	0,30
RLL16	0,28
RLL18	0,00
RLL19	0,25

Os resultados obtidos estão de acordo com os relatos da literatura que sugerem que nos méis brasileiros os ácidos fenólicos são bem mais abundantes que os flavonóides. As amostras **RLL03** e **RLL18** não apresentaram flavonóides em sua análise por CLAE (Tabela 29, p. 136; LIANDA, 2004), e, portanto não apresentaram valores positivos nesse ensaio. Novamente, os méis silvestres apresentaram teores de flavonóides totais superiores aos méis de laranjeira, conforme foi encontrado para fenóis totais e atividade antioxidante. Além disso, foi possível observar uma semelhança entre as amostras de méis laranjeiras **RLL15**, **RLL16** e **RLL19** de mesma origem geográfica, conforme os resultados de teor de fenóis totais. A amostra **RLS10** embora tenha apresentado apenas a morina por CLAE (Tabela 29, p.136; LIANDA, 2004), não apresentou resultado para o ensaio de flavonóides, podendo ser justificado pela sua baixa proporção no mel (área relativa) ou mesmo porque o ensaio aqui em questão é menos sensível do que a análise por CLAE. Os maiores teores de flavonóides encontrados para as amostras **RLS23** (4,27 mg) e **RLS21** (1,6 mg) podem ser justificados pelas presenças dos flavonóides morina e isoquercetina e quercetina, respectivamente, identificados por CLAE-DAD nesse trabalho (Tabela 28, p.135). O uso do cloreto de alumínio para a determinação da quantidade de flavonóides totais não é, no entanto, um procedimento isento de limitações. Ele pode ser pouco exato, ou seja, o valor que ele fornece pode ser diferente (geralmente inferior) em relação à quantidade de flavonóides totais realmente presente na amostra analisada.

Na Tabela 24 foram reunidos os resultados dos teores de fenóis totais, de flavonóides totais, CE₅₀ dos extratos e CE₅₀ dos méis para facilitar a comparação.

Tabela 24. Resultados dos teores de fenóis e flavonóides totais, CE₅₀ dos extratos e dos méis.

Amostras – MÉIS	Teor de Fenóis totais em equivalentes de ácido gálico (mg/100 g de mel)	Teor de Flavonóides totais em equivalentes de quercetina (mg/100 g de mel)	Média CE₅₀ [µg·mL⁻¹] - EXTRATOS	Média CE₅₀ [mg·mL⁻¹] - MÉIS
Méis silvestres				
RLS10	78,2	0,00	6,17	10,81
RLS12	42,8	0,25	26,10	19,74
RLS21	57,2	1,6	29,59	18,42
RLS23	54,0	4,27	30,60	17,52
Méis de laranjeira				
RLL03	40,1	0,00	52,87	33,21
RLL15	35,7	0,30	19,61	36,22
RLL16	38,8	0,28	29,74	40,80
RLL18	53,2	0,00	9,74	29,85
RLL19	34,0	0,25	21,22	52,64

Analisando os resultados, foi observado que as amostras de méis silvestres apresentaram maiores teores de compostos fenólicos e melhores atividades antioxidantes quando comparados às amostras de méis de laranjeira. No entanto, a atividade antioxidante (CE₅₀) para os extratos dos méis de laranjeira apresentou-se similar aos extratos de méis silvestres, exceto para o extrato **RLL03** (52,871 µg·mL⁻¹), resultado já discutido anteriormente (p. 84). Parece existir alguma relação entre o teor em fenóis totais e a atividade antioxidante revelada, dado que as duas amostras (**RLS10** e **RLL18**) que são mais ricas nestas substâncias são também as que apresentam maior atividade. Os ácidos gálico e protocatecuico foram as principais substâncias fenólicas presentes nos extratos dos méis **RLS10** e **RLL18**, respectivamente, por CLAE (LIANDA, 2004). Essas substâncias possuem propriedades que retardam ou inibem significativamente a oxidação de lipídios ou outras moléculas através do seqüestro de espécies reativas ao oxigênio (ERO). Através de cromatografia líquida de fase reversa, LIANDA (2004) foram detectadas as presenças desses e de outros ácidos fenólicos, bem como de flavonóides nos extratos de méis brasileiros.

7.3 – Análises das Substâncias Fenólicas

No mel existem numerosos compostos fenólicos especialmente flavonóides e ácidos fenólicos. Nos méis europeus, os flavonóides predominam entre as substâncias fenólicas BANKOVA *et al.*, 1982; AMIOT *et al.*, 1989; FERRERES *et al.*, 1992; SABATIER *et al.*, 1992; TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 1993; ANDRADE *et al.*, 1997). Por outro lado, as pesquisas recentes sugerem que nos méis brasileiros os ácidos fenólicos são bem mais abundantes que os flavonóides (DA SILVA, 2004; LIANDA, 2004; MONTAGNI, 2005). Embora a concentração das substâncias fenólicas nos méis brasileiros seja relativamente pequena, é possível identificá-los e utilizar os perfis obtidos como parâmetro para o controle de qualidade químico. Sendo assim, a identificação desses derivados fenólicos poderá vir a auxiliar na caracterização da origem floral e geográfica de diferentes méis. Como o conteúdo dessas substâncias varia com o tipo floral, tem-se a possibilidade de utilizar tais substâncias como marcadores químicos do mel o que complementaria a sua análise microscópica (análise polínica).

Embora os processos clássicos baseados na cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) e de coluna aberta (CC) continuem sendo utilizados para a separação e purificação de produtos naturais, ênfase será dada aqui à CLAE acoplada ao detector de arranjo por fotodiodo devido a sua rapidez e reprodutibilidade para a identificação das substâncias fenólicas.

Dando continuidade ao trabalho de pesquisa do nosso grupo (DA SILVA, 2004; LIANDA, 2004; MONTAGNI, 2005), este trabalho busca caracterizar os méis brasileiros de *Apis mellifera*, através da identificação das substâncias fenólicas (ácidos fenólicos e flavonóides) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de fotodiodo.

A escolha da CLAE com fase reversa (octadecil-C18) deve-se à sua rapidez e reprodutibilidade para a identificação de substâncias fenólicas quando acoplada ao detector de arranjo de fotodiodos, utilizando-se da espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta.

A identificação dos ácidos e flavonóides foi feita através da comparação dos tempos de retenção, juntamente com as análises dos respectivos espectros de absorção no UV, comparado aos dos padrões autênticos. Entretanto, nem todos os picos puderam ser identificados dessa forma, pois os padrões foram escolhidos de acordo com a literatura prévia e a disponibilidade no laboratório, não sendo suficientes para monitorar todos os picos presentes nos cromatogramas. Além do uso da CLAE, a cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) também foi usada para comparar os fatores de retenção (R_f) das substâncias presentes com aqueles dos padrões, com objetivo de auxiliar na caracterização das substâncias fenólicas presentes no mel.

7.3.1 – Extração das substâncias fenólicas dos méis

Com o objetivo de se obter frações ricas nos compostos de interesse e considerando-se a complexidade da matriz do mel, a metodologia extrativa adotada foi realizada segundo

protocolo descrito na literatura (TOMÁS-BARBERÁN, *et al.*, 2001; FERRERES *et al.*, 1994; MARTOS *et al.*, 2000), sendo feitas algumas adaptações (LIANDA, 2004).

De acordo com a descrição na parte experimental e esquema da Figura 15 (p. 47) optou-se muitas das vezes trabalhar tanto com extrato etéreo como com o de acetato de etila, para garantir o máximo de recuperação das substâncias fenólicas. Na apresentação dos resultados será indicado quando estes dois solventes foram ou não utilizados.

Os extratos etéreo (**a**) e em acetato de etila (**b**) das amostras de méis (p. 47) após serem secos em rotavapor, foram primeiramente analisados por CCDA com o objetivo de avaliar qualitativamente o perfil das substâncias fenólicas presentes na matriz do mel, antes de serem analisados por CLAE-DAD.

A escolha do solvente (éter e/ou acetato de etila) no processo de extração se baseou na eficiência e reprodutibilidade do método para extrair as substâncias fenólicas da matriz do mel. Este fato pode ser observado a partir das análises das áreas relativas dos picos obtidas nos cromatogramas (CLAE), bem como através do cálculo do rendimento bruto obtido para o peso do extrato seco, observando o grau de recuperação após os processos extrativos. Partindo-se de 50 g de amostra de mel a massa do extrato fenólico obtida variou de 10 a 53 mg dependendo do solvente utilizado e do tipo de mel (silvestre, laranjeira ou eucalipto).

A escolha da coluna de fase reversa C-18 foi baseada nos trabalhos desenvolvidos anteriormente pelo nosso grupo (DA SILVA, 2004; LIANDA, 2004; MONTAGNI, 2005), porém alterando as demais condições cromatográficas (fase móvel, velocidade de fluxo e tempo de análise) para permitir a análise dos ácidos fenólicos (benzóicos e cinâmicos) e flavonóides (livres e glicosilados) em uma mesma corrida. Aqui serão apresentados apenas os resultados das condições consideradas mais adequadas para as análises desses méis.

7.3.2 – Perfis cromatográficos dos padrões fenólicos

Primeiramente, os padrões foram analisados em cromatoplasas de fase normal, com o propósito de observar o fator de retenção (R_f), bem como o aspecto e cor de suas manchas observadas pela irradiação da luz UV nos comprimentos de onda de 254 nm e 366 nm (LIANDA, 2004).

Cada padrão de ácido fenólico e de flavonóide foi analisado por CLAE-UV individualmente, para terem seus tempos de retenção determinados, e posteriormente foram preparados como misturas. Como alguns ácidos e alguns flavonóides apresentaram tempos de retenção muito próximos (devido às características estruturais), apesar das curvas de absorção no ultravioleta serem distintas, estes foram reunidos, com o intuito de facilitar as análises, em quatro misturas diferentes. As misturas foram denominadas **A**, **B** (para os ácidos fenólicos), **C** e **D** (para os flavonóides), e o ácido cafeico analisado sozinho. As informações obtidas, por CLAE-UV, para os tempos de retenção dos padrões nas misturas foram utilizadas, posteriormente, para desenvolver as análises realizadas no CLAE-DAD (trabalho desenvolvido na UNRC, Universidad Nacional de Rio Cuarto). Com o uso do CLAE-DAD onde o comprimento de onda foi variável de 200 a 400 nm na mesma análise, foi possível reduzir o número de misturas dos padrões para três, as quais foram

denominadas **Misturas 1, 2 e 3**, após os devidos ajustes concluídos.

Nas Tabelas 25, 26 e 27 foram reunidos os tempos de retenção e os respectivos comprimentos de onda de cada padrão nas misturas 1, 2 e 3, respectivamente, para facilitar a comparação com os dados obtidos nas amostras dos extratos dos méis. Os cromatogramas e os espectros de absorção no UV correspondentes às análises dos ácidos e dos flavonóides padrões estão nas Figuras 51-53 (p. 106-108).

Tabela 25. Tempos de retenção (t_R) e comprimentos de onda (λ_{max}) das substâncias contidas na **Mistura 1** analisadas por CLAE –DAD.

Mistura 1	t_R (minutos)	λ_{max} (nm)
Ácido Vanílico	11,93	260,80 ; 291,80
Isoquercetina	18,90	255 ; 352,80
Morina	21,07	255 <i>om</i> ; 351,80
Quercetina	22,32	255 ; 374,80
Canferol	24,17	253 <i>om</i> ; 360,80

om = ombro

Nessa mistura, as curvas de absorção no ultravioleta para as substâncias isoquercetina (λ_{max} = 255 e 352,8 nm) e morina (λ_{max} = 255 e 351,8 nm) mostraram-se semelhantes, sendo importante assim, a observação dos tempos de retenção para a diferenciação dessas substâncias.

Tabela 26. Tempos de retenção (t_R) e comprimentos de onda (λ_{max}) das substâncias contidas na **Mistura 2** analisadas por CLAE-DAD.

Mistura 2	t_R (minutos)	λ_{max} (nm)
Ácido cafeico	12,88	(banda II <i>om</i>) ; 323,80
Rutina	19,02	256 ; 353,80
Ácido cinâmico	20,42	277,80
Naringenina	22,13	288,80 ; (banda I <i>om</i>)

om = ombro

Tabela 27. Tempos de retenção (t_R) e comprimentos de onda (λ_{max}) das substâncias contidas na **Mistura 3** analisadas por CLAE –DAD.

Mistura 3	t_R (minutos)	λ_{max} (nm)
Ácido Gálico	4,15	270,80
Ácido Protocatecuico	7,17	259,80 ; 294,80
Ácido <i>para</i> -hidroxi-benzóico	10,07	255,80
Ácido Sirínico	12,98	274,80
Ácido <i>para</i> -cumárico	15,17	308,80
Ácido <i>para</i> -metoxi-benzóico	17,48	255,80
Tricetina	21,35	255 ; 350,80

Para a interpretação dos resultados obtidos dos cromatogramas para as substâncias que apresentaram estruturas químicas e/ou comportamento químico semelhantes, cuidados prévios foram tomados. Devido a possíveis interações entre as substâncias nas misturas, em alguns casos ocorreram coincidências ou pequenas variações nos tempos de retenção quando comparados aos padrões analisados individualmente. Sendo assim, foi imprescindível o uso da curva de absorção no ultravioleta para a identificação das substâncias na matriz. Em alguns casos, até mesmo a união destas duas informações não foi suficiente para confirmar a estrutura de uma determinada substância nos extratos do mel, sendo necessário o uso da CCDA em fase normal para auxiliar.

Este fato pode ser exemplificado com os pares de substâncias: isoquercetina e rutina (t_R = 18,90 e 19,02 min, respectivamente), e morina e tricetina (t_R = 21,08 e 21,35, respectivamente). Em ambos os pares de substâncias foram observados semelhanças tanto nos tempos de retenção quanto nas curvas de absorção no ultravioleta (Tabelas 25-27; Figuras 51-53, p. 106-108). Nestes casos foram imprescindíveis as análises dos fatores de retenção (R_f) por cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) em fase normal, onde as substâncias isoquercetina (R_f = 0,50) e rutina (R_f = 0,38), bem como morina (R_f = 0,48) e tricetina (R_f = 0,43) puderam ser diferenciadas, permitindo assim, confirmar suas respectivas estruturas. A diferença entre as substâncias isoquercetina e rutina é apenas no açúcar no C-3, que para rutina é um dissacarídeo, a rutinose, e para a isoquercetina é um monossacarídeo, a glicose, o que tornaria a sua identificação difícil na matriz do mel. Enquanto a morina (flavonol) apresenta duas hidroxilas localizadas em C-2' e C-4', respectivamente, a tricetina (flavona) apresenta três hidroxilas localizadas em C-3', C-4' e C-5' (anel B do flavonóide).

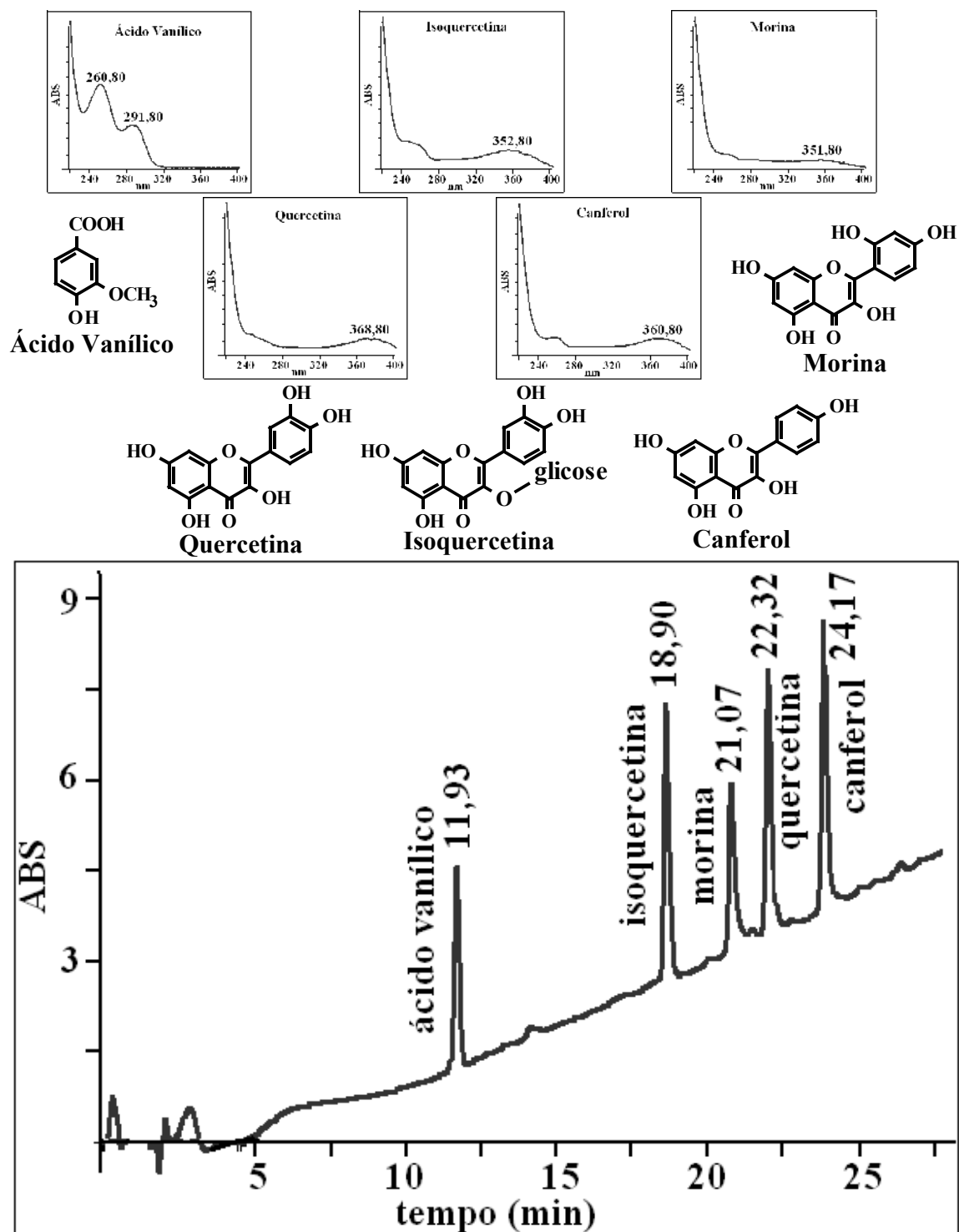


Figura 51. Mistura 1 analisada por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 μ m), fluxo de 0,2 mL.min⁻¹, fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), 200-400 nm.

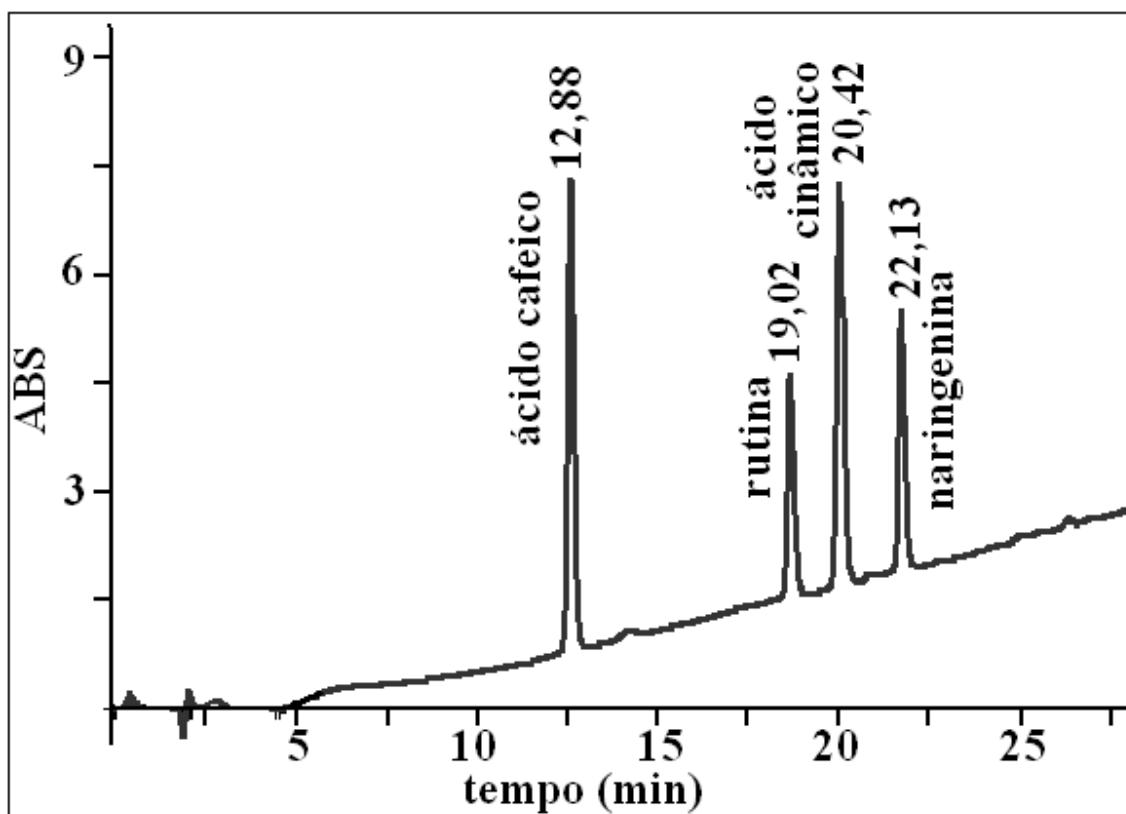
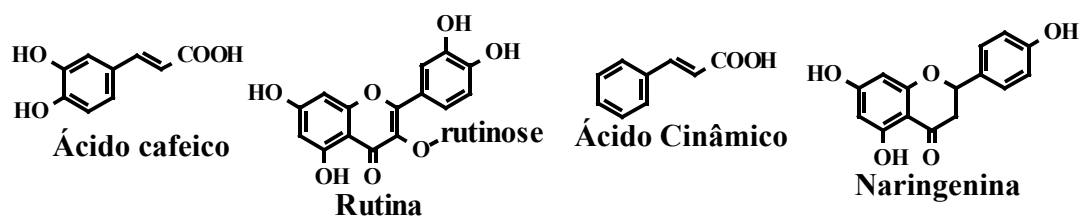
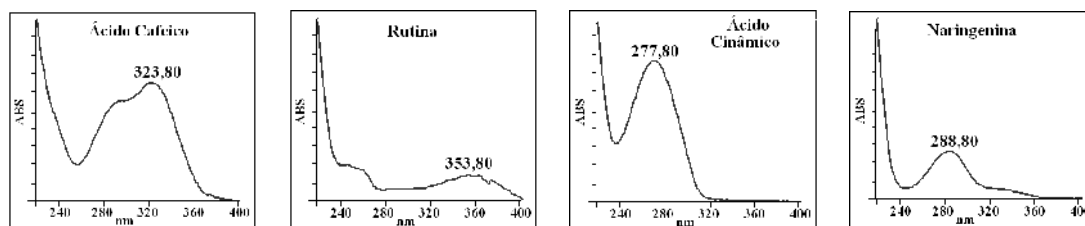


Figura 52. Mistura 2 analisada por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 μ m), fluxo de 0,2 mL.min⁻¹, fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), 200-400 nm.

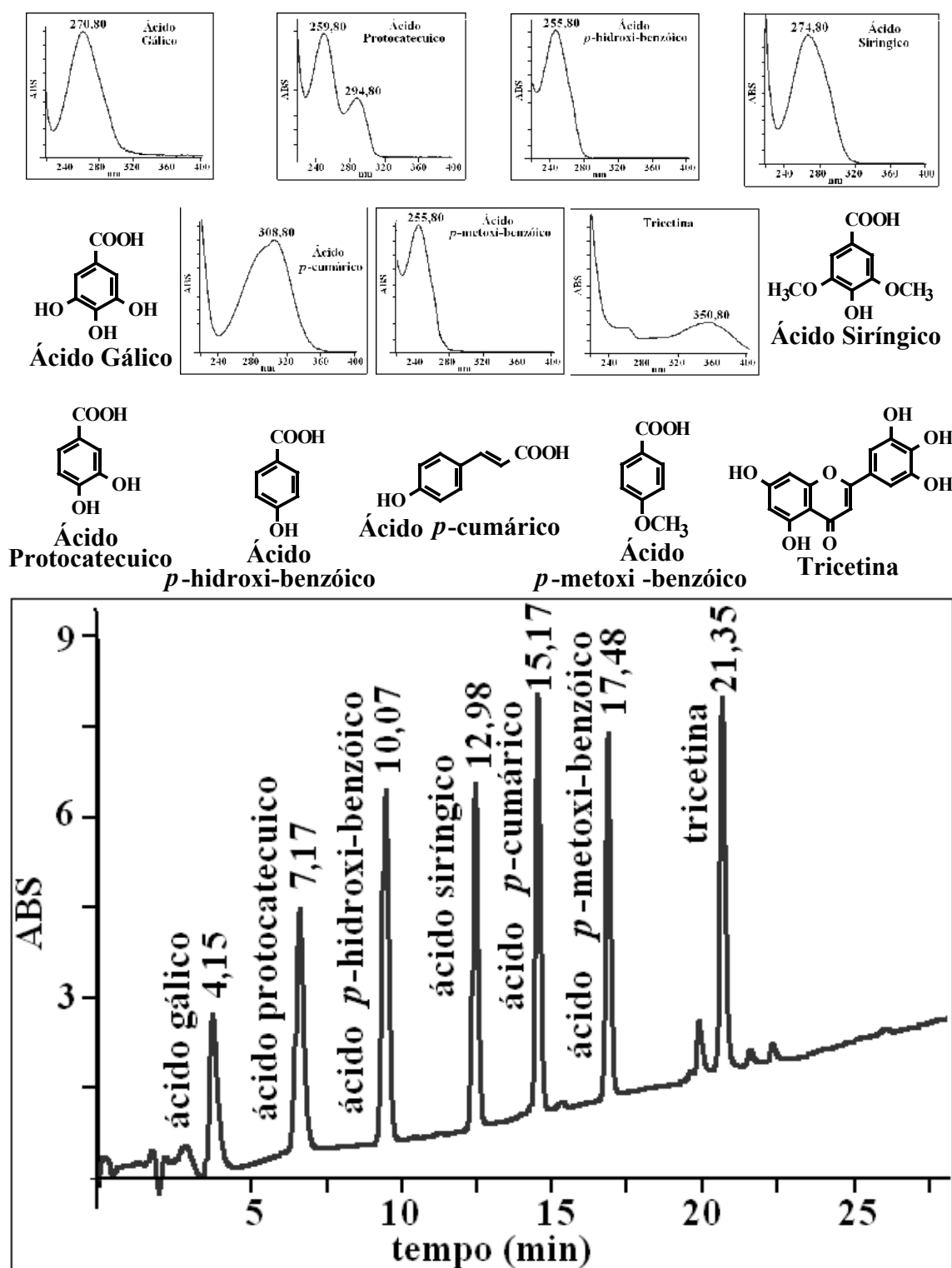


Figura 53. Mistura 3 analisada por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 μ m), fluxo de 0,2 mL.min⁻¹, fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), 200-400 nm.

As condições cromatográficas aqui utilizadas permitiram melhorias na resolução,

reprodutibilidade e no tempo total de análise para os padrões das substâncias fenólicas em comparação aos apresentados anteriormente (LIANDA, 2004). Em cerca de 25 minutos de análise, foi possível, numa só corrida, abranger os ácidos e flavonóides estudados.

7.3.2.1 – Considerações sobre as absorções no UV dos padrões

A metodologia extrativa associada à análise por CLAE-DAD permitiu identificar os ácidos fenólicos e flavonóides quanto à sua absorção no ultravioleta sem que para isso fosse necessário o seu isolamento.

A análise dos espectros de absorção no ultravioleta obtido pelo detector de arranjo de fotodiodo e acumulados com varredura de 230-400 nm permitiu que se fizesse algumas considerações relativas à estrutura das substâncias cromatografadas.

Inicialmente, serão apresentadas algumas considerações sobre os espectros de absorção no ultravioleta para os ácidos fenólicos, e posteriormente para os flavonóides, para que possam auxiliar a sua identificação na matriz do mel.

a) Ácidos fenólicos

Pelos dados acumulados de absorção espectroscópica no detector de arranjo de fotodiodo, determinou-se imediatamente o tipo de composto fenólico em questão. Os ácidos fenólicos encontrados nas amostras dos méis estudadas foram os derivados de ácido benzóico (esqueleto C6-C1) e os derivados de ácido cinâmico (esqueleto C6-C3), cuja origem biossintética tem como precursor importante o ácido chiquímico, como mostrado no item 2 (Figura 2, p. 8). Esta classificação facilitou a identificação pelo espectro de ultravioleta quanto ao esqueleto estrutural básico, onde os derivados de ácido benzóico estudados foram: ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido *para*-hidroxibenzóico, ácido siríngico, ácido vanílico e ácido *para*-metoxi-benzóico (Figura 5, p. 10), enquanto os derivados do ácido cinâmico foram: ácido *para*-cumárico, ácido cafeico e ácido cinâmico (Figura 3, p. 9).

Para efeito de discussão os espectros dos ácidos *para*-hidroxibenzóico e cinâmico foram utilizados como modelo para se discutir as modificações nas bandas de absorção dos espectros de todos os demais padrões obtidos pelo detector de arranjo de fotodiodo. Para o ácido *para*-hidroxibenzóico com apenas um grupo hidroxila no anel aromático, observou-se uma única banda de absorção de λ_{max} a 255,80 nm, referente à banda B dos sistemas aromáticos (transição $\pi - \pi^*$). O ácido cinâmico, embora não tenha o grupamento hidroxila, manteve a mesma banda B de absorção máxima no ultravioleta ($\lambda_{\text{max}} = 277,80$ nm), porém com um desvio batocrômico de 22 nm devido à extensão de conjugação do anel com o sistema olefínico presente na unidade C3 (Figura 54).

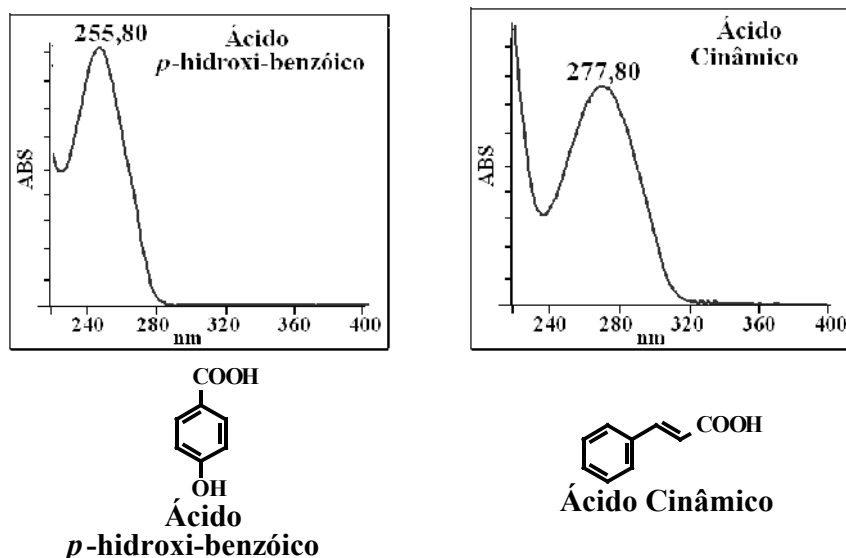


Figura 54. Espectros de absorção no UV dos ácidos *para*-hidroxibenzóico e cinâmico obtidos pelo detector de arranjo de fotodiodos.

Para os derivados do ácido benzóico que apresentam três grupos hidroxila no anel aromático a alteração que se verifica é um desvio batocrômico de 15-20 nm quando comparados ao ácido *para*-hidroxi-benzóico ($\lambda_{\text{max}} = 255,80 \text{ nm}$; PAVIA & LAMPMAN, 1979), independentemente do fato de estarem ou não substituídos por metilas. Como exemplo, temos o ácido gálico ($\lambda_{\text{max}} = 270,80 \text{ nm}$) e o ácido siríngico ($\lambda_{\text{max}} = 274,80 \text{ nm}$; Tabela 27, p. 105; Figura 53, p. 108). Este dado está de acordo com esperado com base nos efeitos dos substituintes previstos pelas regras de Woodward (WILLIAMS & FLEMING, 1995).

Já os derivados do ácido benzóico que possuem substituintes nas posições 3, 4 do anel (*orto*-substituídos) apresentam espectros com duas bandas de absorção, independente dos substituintes serem hidroxilas e/ou metoxilas, como podem ser observados para os espectros dos ácidos protocatecuico ($\lambda_{\text{max}} = 259,80 \text{ e } 294,80 \text{ nm}$) e vanílico ($\lambda_{\text{max}} = 260,80 \text{ e } 291,80 \text{ nm}$; Tabelas 25 e 27, p. 104 e 105; Figuras 51 e 53, p. 106 e 108).

Para os derivados de ácido cinâmico também foi observado um desvio batocrômico em relação ao ácido cinâmico padrão ($\lambda_{\text{max}} = 277,80 \text{ nm}$), quando estes possuem substituintes nas posições 3, 4 do anel aromático, independentes de serem hidroxilas e/ou metoxilas. Como podem ser observados nos espectros dos ácidos *para*-cumárico ($\lambda_{\text{max}} = 308 \text{ nm}$) e cafeico ($\lambda_{\text{max}} = 323,80 \text{ nm}$).

b) Flavonóides

A espectroscopia no ultravioleta associada à CLAE é a uma técnica bastante útil para a detecção de flavonóides, durante os processos de monitoramento e/ou isolamento. O

espectro no ultravioleta de um flavonóide é normalmente determinado em etanol ou metanol e consiste tipicamente em duas bandas de absorção máxima: uma ocorrendo entre 240-285 nm (banda II, devido à absorção do anel **A**, sistema benzoila) e outra entre 300-450 nm (banda I, devido ao anel **B**; sistema cinamoila; Figura 7, p. 11; SIMÕES *et al.*, 2000; HARBONE, 1994). A posição precisa e as intensidades relativas destes máximos de absorção dão uma valiosa informação quanto à natureza do flavonóide e ao seu padrão de oxigenação.

Numa análise rápida das Tabelas 25 a 27 (p. 104-105) verificou-se facilmente uma semelhança nos espectros de absorção dos flavonóides, tanto para a classe dos flavonóis glicosilados, como a rutina (quercetina-3-*O*-rutinosídeo) e isoquercetina (quercetina-3-*O*-glicosídeo); como para os flavonóis e flavona agliconas: quercetina (3, 5, 7, 3', 4'-pentaidroxi-flavona), morina (3, 5, 7, 2', 4'-pentaidroxi-flavona), canferol (3, 5, 7, 4'-tetraidroxi-flavona) e tricetina (5, 7, 3', 4', 5'-pentaidroxi-flavona) que apresentaram duas bandas de absorção características (banda I e banda II). A diferença, no entanto, foi observada para a naringenina (5, 7, 4'-triidroxi-flavanona), que por ser uma flavanona apresentou apenas uma banda de absorção intensa relacionada ao sistema benzoila (banda II, anel A) (Figura 55; Figuras 8, p. 13).

A análise dos espectros de absorção no ultravioleta forneceu considerações importantes sobre o tipo de flavonóide e o seu padrão de oxigenação, particularmente pela análise da banda I. Nas flavonas e flavonóis a banda I aparece entre 304-355 nm, já as flavanonas exibem uma banda I de baixa intensidade, freqüentemente, aparecendo como ombro da banda II (Tabela 26, p. 104; Figura 52, p. 107).

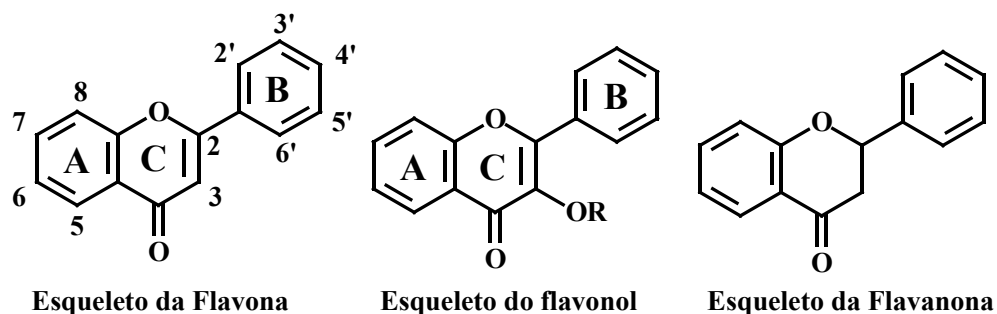


Figura 55. Esqueletos básicos de flavonóides.

Quando os espectros dos padrões foram analisados, observou-se que, se os grupos hidroxilas nas posições C-3, C-5 ou C-4' dos núcleos das flavonas ou flavonóis, eram metilados ou glicosilados, ocorria desvios hipsocrômicos, em especial na banda de maior comprimento de onda (banda I). Esse fato foi observado nos espectros da isoquercetina ($\lambda_{\text{max}} = 352,80$ nm, banda I) e da rutina ($\lambda_{\text{max}} = 353,80$ nm, banda I) quando comparados ao espectro da quercetina ($\lambda_{\text{max}} = 368,80$ nm), que apresentaram um efeito hipsocrômico de cerca de 20 nm, em virtude da presença do açúcar no C-3, glicose e rutnose, respectivamente.

A partir das análises dos padrões (tempos de retenção e espectros de UV) obtidas pela técnica de CLAE-DAD, foi possível identificar as substâncias fenólicas nos extratos de méis sem a necessidade de isolar os compostos de interesse, admitindo assim uma avaliação segura.

7.4 – Perfis das Substâncias Fenólicas nos Méis por CLAE-DAD

As análises preliminares realizadas por CCDA permitiram selecionar tanto os méis com perfis mais ricos em fenólicos quanto as substâncias fenólicas padrões que deveriam fazer parte desse estudo. Aqui serão apresentadas e discutidas somente as análises por CLAE-DAD dos méis e padrões que foram selecionados. Todas as amostras dos extratos dos méis foram analisadas em triplicata.

Após as análises dos padrões dos ácidos fenólicos e flavonóides através dos seus perfis cromatográficos (t_R) e seus respectivos espectros de absorção no UV, passou-se à identificação daquelas substâncias que estavam presentes nos méis silvestres, de laranjeira e de eucalipto.

A partir da análise comparativa dos cromatogramas obtidos para as amostras de méis silvestres (heterofloral – de origem provável da Mata Atlântica; Figuras 56-58, p. 114-118), de laranjeira (monofloral; Figuras 59-65, p. 120-127) e de eucalipto (monofloral; Figuras 66-68, p. 129-131) foi possível observar um perfil mais homogêneo para as substâncias presentes nos méis monoflorais do que para os heteroflorais. Esta avaliação, a princípio, poderia facilitar a definição dos marcadores químicos para caracterizar a origem botânica e/ou geográfica dos méis.

A comparação dos perfis cromatográficos dos méis monoflorais (laranjeira e eucalipto) com o mel heterofloral (silvestre) mostrou que as substâncias fenólicas encontradas, não foram as mesmas na sua totalidade. Quando os cromatogramas e os respectivos espectros de absorção no UV foram analisados, pode-se verificar uma diferença bastante pronunciada, no que diz respeito às áreas relativas dos picos, bem como a existência de picos distintos para cada amostra de mel analisada. No entanto, para as sete amostras de méis de laranjeira e três amostras de méis de eucalipto analisadas por CLAE-DAD quando comparadas entre si, foi observado uma maior semelhança quanto ao perfil cromatográfico das substâncias fenólicas do que aquele encontrado nas três amostras de méis silvestres.

Para facilitar a visualização e interpretação dos dados serão apresentados os cromatogramas das amostras de méis com as respectivas curvas de absorção no ultravioleta para as substâncias identificadas, além das curvas de UV dos padrões correspondentes. Primeiramente serão apresentados os cromatogramas dos extratos dos méis silvestres, depois dos méis de laranjeira e, por fim, dos méis de eucalipto.

7.4.1 - Análises dos extratos dos méis silvestres

Para avaliar o perfil cromatográfico das substâncias fenólicas foram analisadas três amostras de méis silvestres codificadas como **RLS21**, **RLS23** e **RLS24**.

A análise do perfil cromatográfico para o mel **RLS21** (extrato acetato de etila) permitiu identificar cinco substâncias fenólicas, sendo quatro ácidos fenólicos: o ácido protocatecuico ($t_R = 7,15$ min), o ácido *para*-hidroxi-benzóico ($t_R = 10,05$ min), o ácido *para*-cumárico ($t_R = 15,07$ min) e o ácido *para*-metoxi-benzóico ($t_R = 17,46$ min), além do flavonóide quercetina ($t_R = 22,18$ min). Esta amostra foi adquirida na região de Mata Atlântica, Itararé-SP (janeiro/2004), e assim como outras estudadas anteriormente que continha morina e quercetina (LIANDA, 2004) apresentou flavonóide. No cromatograma desta amostra foram observados outros picos ($t_R = 18,50$ min, $t_R = 19,20$ min e $20,52$ min) que não puderam ser identificados, pois não tiveram os seus tempos de retenção e espectros no UV relacionados a nenhum dos padrões estudados.

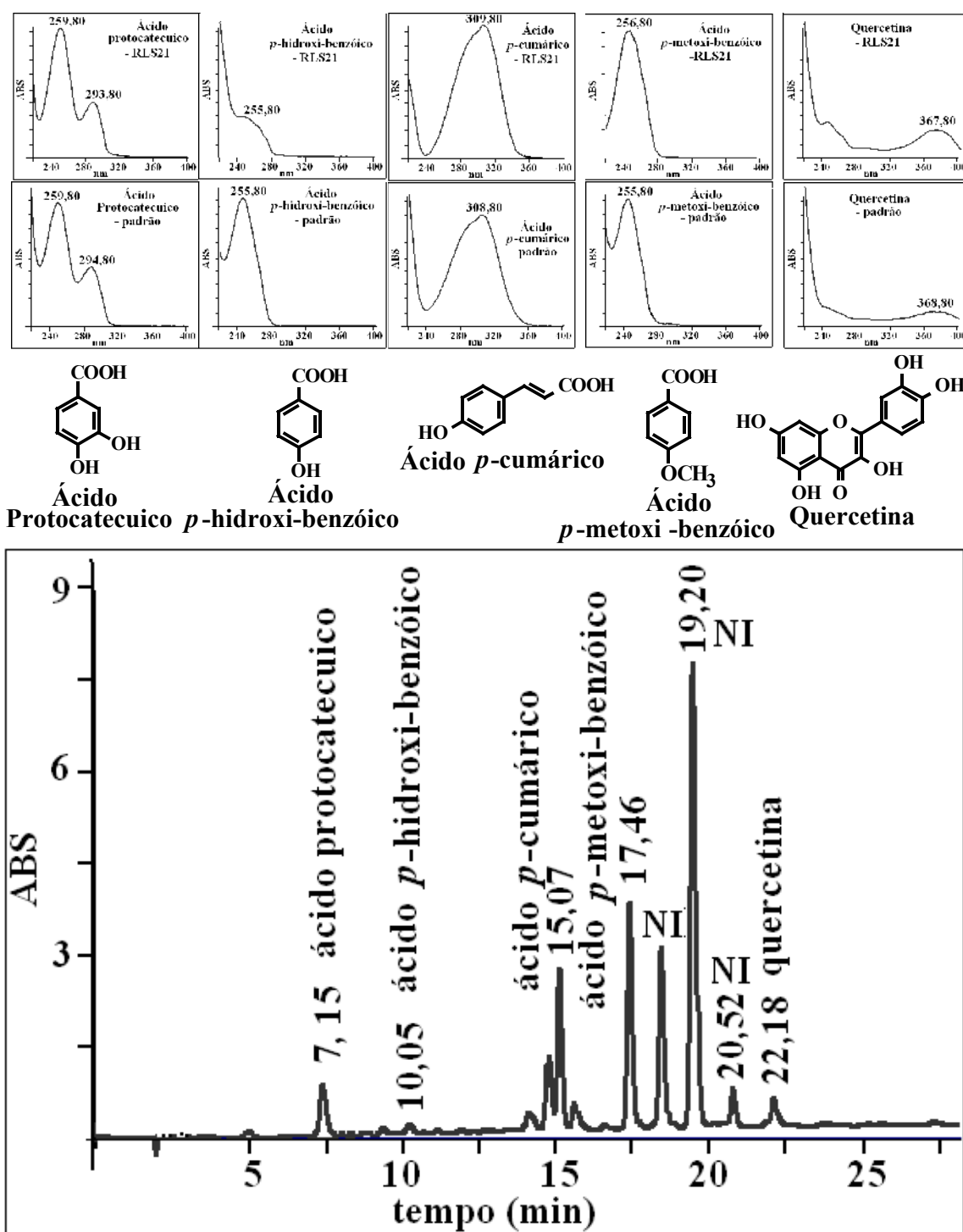


Figura 56. Análise da amostra RLS21 (extraída com acetato de etila) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 μ m), fluxo de 0,2 mL.min⁻¹, fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), de 200-400 nm. NI – picos não identificados.

A amostra de mel silvestre RLS23 (extrato etéreo) foi adquirida em apiário localizado na Mata Atlântica, Jquitiba-SP, e coletada nessa região, segundo o apicultor, em março de 2004. A análise do seu perfil cromatográfico permitiu identificar seis substâncias fenólicas, sendo quatro os seguintes ácidos fenólicos: ácido *para*-hidroxibenzóico ($t_R = 9,72$ min), ácido vanílico ($t_R = 11,52$ min), ácido *para*-cumárico ($t_R = 15,63$ min) e o ácido *para*-metoxi-benzóico ($t_R = 17,18$ min); e dois flavonóides: isoquercetina ($t_R = 18,65$ min) e morina ($t_R = 20,93$ min). Embora tenham sido observadas pequenas variações nos tempos de retenção das substâncias fenólicas quando comparados aos padrões, devido às possíveis interações existentes na matriz estudada, foi possível identificá-las pelas comparações das curvas no UV. Comparando esta amostra com anterior (RLS21) foi possível observar a ausência do ácido protocatecuico, porém ocorreu a presença de outro derivado do ácido benzóico, também dissustituído, com uma hidroxila em C-4 e uma metoxila em C-3, o ácido vanílico. Quanto aos flavonóides encontrados, observou-se a presença de isoquercetina e morina, porém houve a necessidade do uso de CCDA para auxiliar na diferenciação com a rutina e tricetina através das medidas do R_f , respectivamente. Como os tempos de retenção e as curvas do UV desses flavonóides se assemelham com os da rutina ($t_R = 19,02$ min) e da tricetina, ($t_R = 21,35$ min), respectivamente, as medidas dos fatores de retenção por CCDA permitiu confirmar que os flavonóides identificados no mel foram isoquercetina ($R_f = 0,50$) e morina ($R_f = 0,48$), e não a rutina ($R_f = 0,38$) e a tricetina ($R_f = 0,43$).

Das substâncias identificadas no cromatograma, os ácidos *para*-cumárico e *para*-metoxi-benzóico foram os constituintes majoritários (área relativa) da amostra **RLS23**.

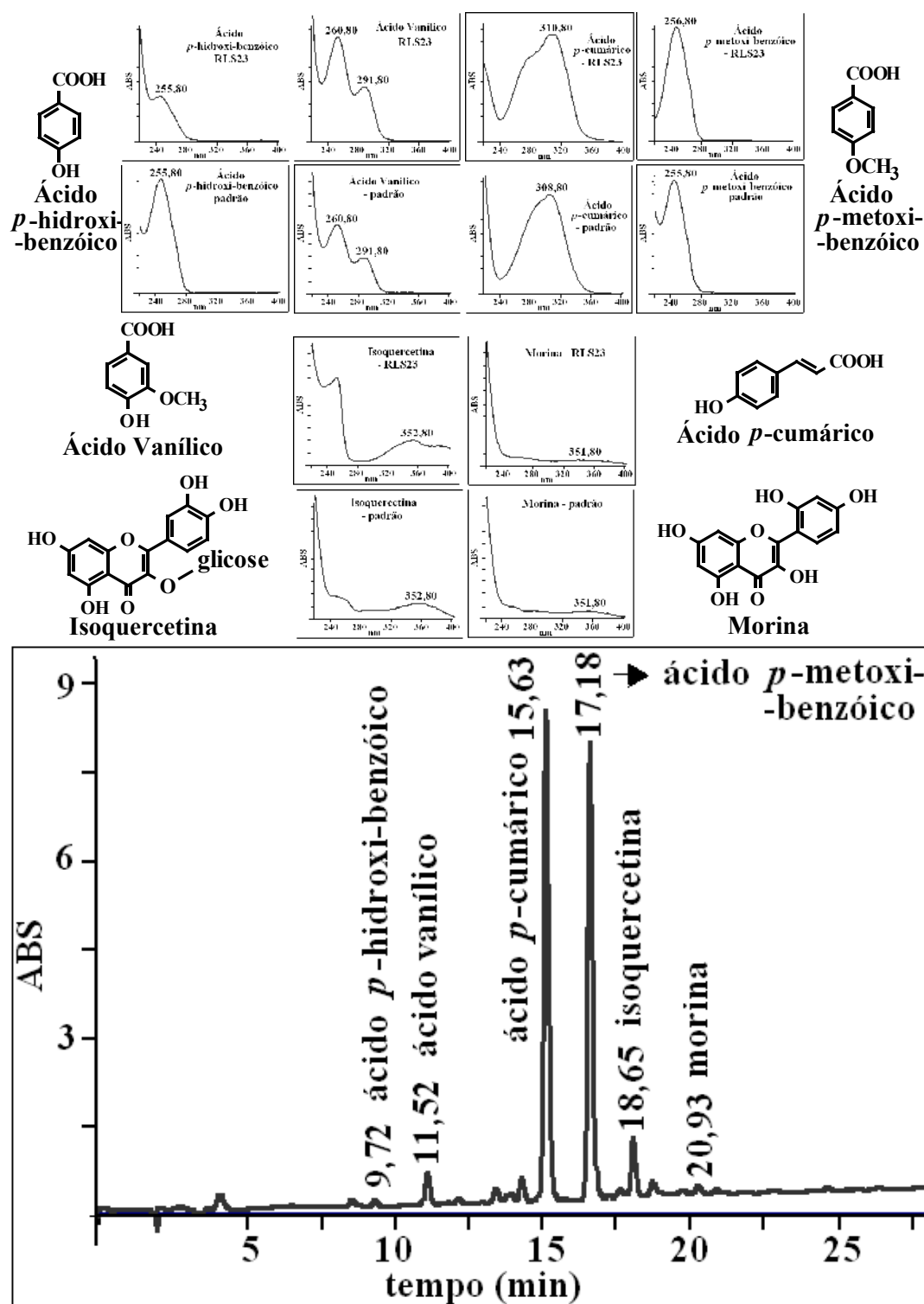


Figura 57. Análise da amostra RLS23 (extraída com éter) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 μ m), fluxo de 0,2 mL.min⁻¹, fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), 200-400 nm.

A amostra de mel silvestre RLS24 (extraída com acetato de etila) foi adquirida da Mata Atlântica, segundo informações do apicultor, do mesmo apiário que a amostra RLS23, em Juitituba-SP, porém coletada em janeiro/2005. Algumas diferenças foram observadas quando os perfis cromatográficos dessas duas amostras foram comparados, evidenciando que dois méis de mesma origem botânica e/ou geográfica, nem sempre podem ser idênticos quali e/ou quantitativamente, em virtude de fatores ambientais ou climáticos, por exemplo. Esta amostra apresentou em seu perfil menor variedade de ácidos fenólicos quando comparados as amostras anteriores (RLS21, RLS23), e foi a única que apresentou o ácido cinâmico e o canferol em sua composição. Além do ácido cinâmico (t_R = 20,06 min) foram identificados também os ácidos protocatecuico (t_R = 6,95 min) e *para*-hidroxi-benzóico (t_R = 9,81 min). Dois flavonóides foram encontrados, a isoquercetina (t_R = 18,75 min) e o canferol (t_R = 23,88 min). Novamente a presença da isoquercetina foi confirmada através da análise por CCDA para diferenciá-la da rutina. Nesta amostra, observou-se também uma maior concentração (áreas relativa) dos flavonóides presentes em relação às amostras anteriores. Alguns picos (t_R = 15,50 min e t_R = 16,68 min) não foram identificados.

Diferente do que foi observado para as amostras **RLS21 e RLS23**, das substâncias identificadas no cromatograma, o ácido cinâmico e isoquercetina foram os constituintes majoritários (área relativa) da amostra **RLS23**, e a presença do canferol foi relatado pela primeira vez em mel brasileiro.

Das três amostras de méis silvestres analisadas (**RLS21, RLS23, RLS24**) apenas o ácido *para*-hidroxi-benzóico foi o constituinte fenólico comum as três amostras.

Comparando-se os perfis cromatográficos das substâncias fenólicas dos méis silvestres brasileiros aqui apresentados com aqueles estudados anteriormente (Tabelas 3 à 5, p. 38 e 39), foi possível observar uma grande variedade entre os ácidos fenólicos identificados, tanto derivados do ácido benzóico quanto derivados do ácido cinâmico, bem como para flavonóides. No entanto, vale à pena destacar que a presença do ácido *para*-hidroxi-benzóico foi comum a todas as amostras de méis silvestres, mesmo sendo oriundas de diferentes regiões (RJ, SP, MT, PR e PB); e os flavonóides quercetina e morina foram os principais flavonóides identificados.

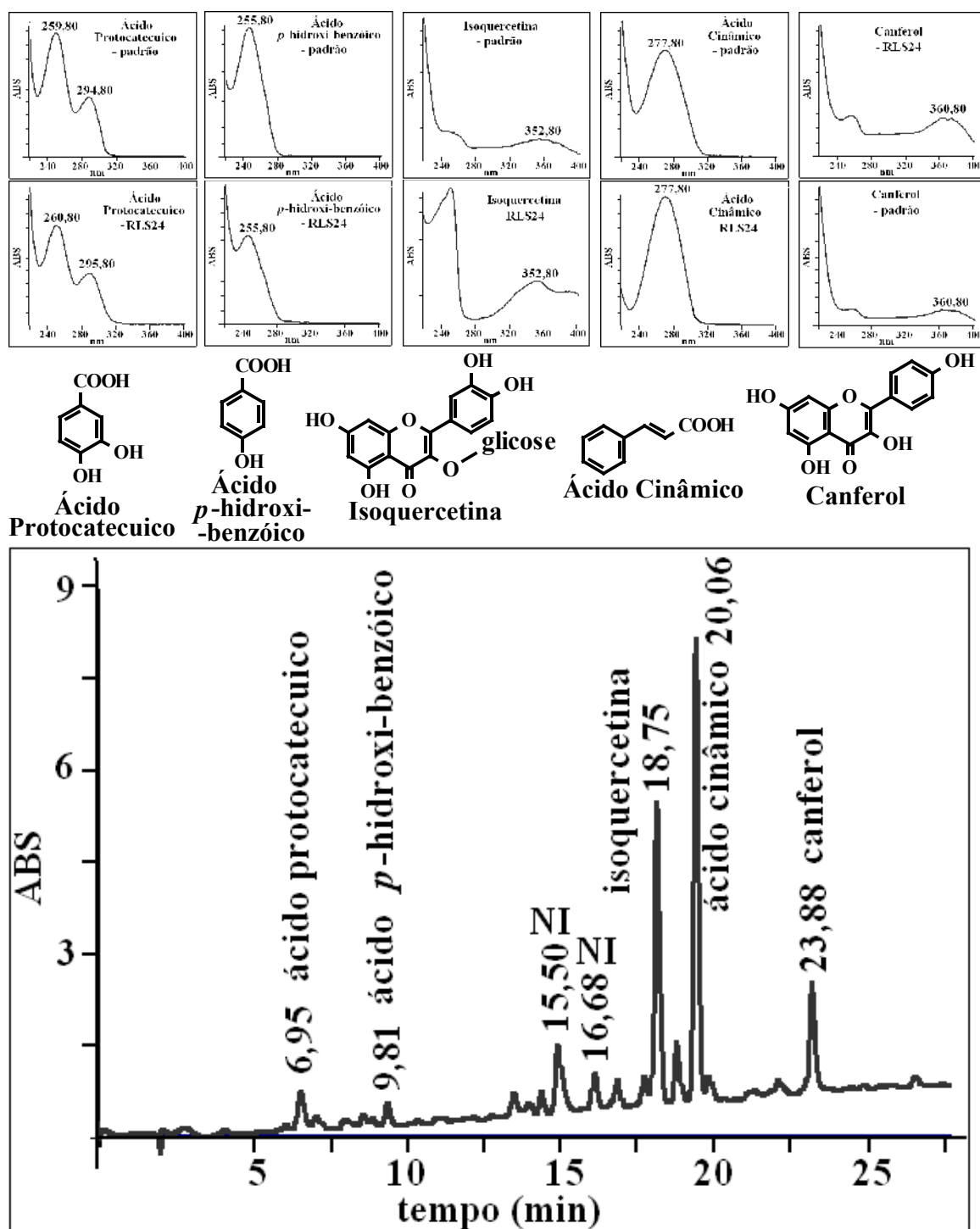


Figura 58. Análise da amostra RLS24 (extraída com acetato de etila) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 μ m), fluxo de 0,2 mL.min⁻¹, fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), 200-400 nm. NI – picos não identificados.

7.4.2 - Análises dos extratos dos méis de laranjeira

Das onze amostras de méis de laranjeira adquiridas (Tabela 7, p. 44), quatro foram descartadas (**RLL22**, **RLL25**, **RLL26** e **RLL27**). As amostras **RLL22** e **RLL27** não apresentaram perfis cromatográficos relacionados aos padrões estudados, enquanto as amostras **RLL25** e **RLL26**, através da análise polínica apresentaram apenas 18 % de pólen *Citrus* e nenhum pólen, respectivamente. A observação desses dados conduziu ao descarte desses méis.

A seguir serão apresentados os resultados obtidos para as amostras que tiveram seus perfis cromatográficos estudados, codificadas como **RLL28**, **RLL29**, **RLL30**, **RLL31**, **RLL32**, **RLL40** e **RLL41**.

A primeira delas, a **RLL28** oriunda de Campestre-MG foi adquirida do comércio local em Águas de Lindóia-SP, em janeiro de 2006. A análise do perfil cromatográfico apresentou alguns picos com tempos de retenção muito próximos daqueles apresentados pelos padrões estudados, porém apenas dois ácidos fenólicos puderam ser identificados quando as suas curvas de absorção no ultravioleta foram comparadas com as dos respectivos padrões. Os ácidos fenólicos identificados, como constituintes minoritários, foram os ácidos *para*-hidroxi-benzóico ($t_R = 9,90$ min) e o *para*-cumárico ($t_R = 14,90$ min), ou seja, um derivado do ácido benzóico e o outro do ácido cinâmico. Os demais picos ($t_R = 4,57$; $7,77$; $11,63$; $19,30$ e $20,40$ min) não puderam ser identificados quando comparados aos padrões.

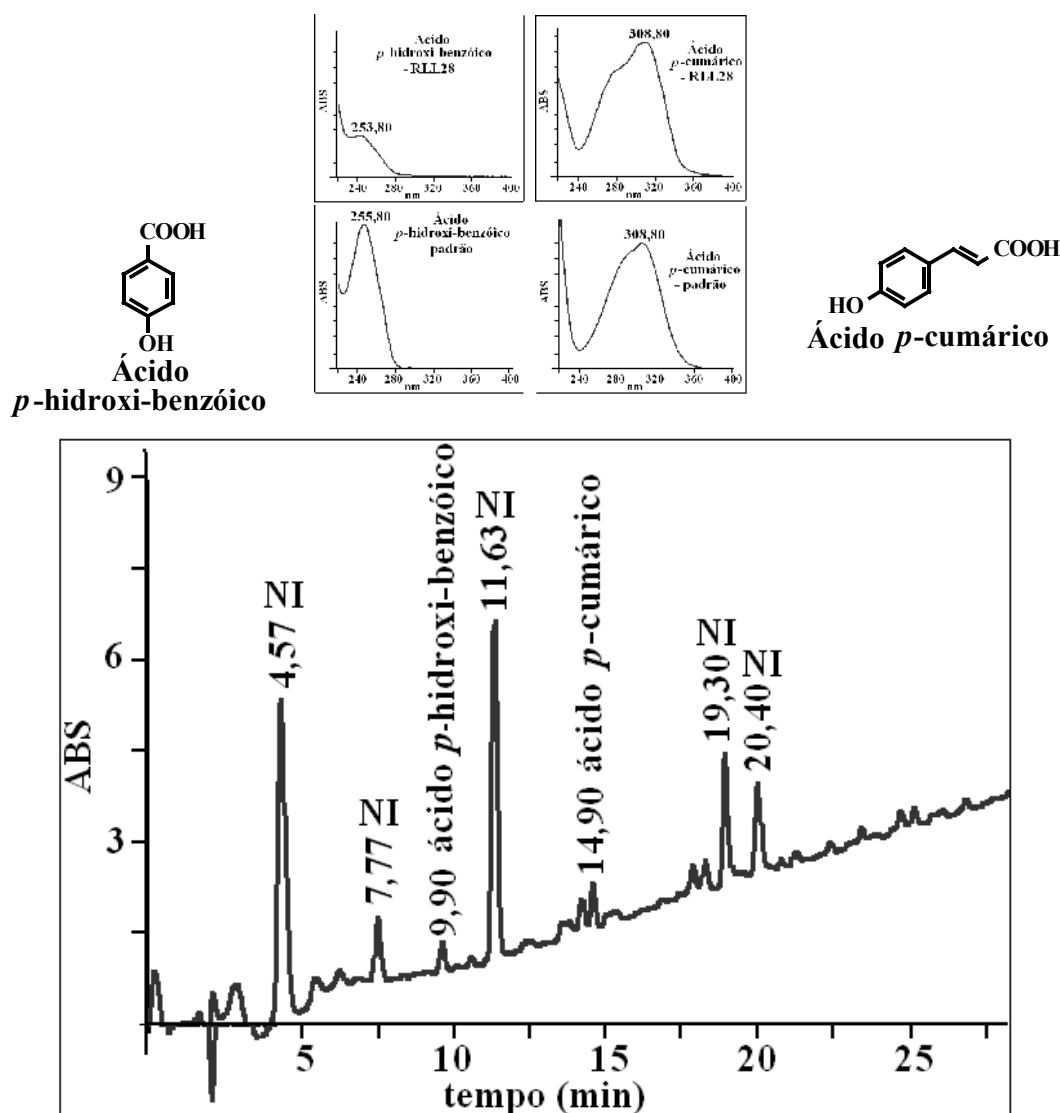


Figura 59. Análise da amostra **RLL28** (extraída com acetato de etila) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 μ m), fluxo de 0,2 mL.min⁻¹, fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), 200-400 nm. NI – picos não identificados.

A amostra **RLL29** foi adquirida também do comércio local em Águas de Lindóia-SP, porém oriunda de Itapira-SP, em maio de 2006. O perfil cromatográfico foi bastante similar ao **RLL28** quanto aos ácidos fenólicos identificados, o *para*-hidroxi-benzóico (t_R = 9,85 min) e o *para*-cumárico (t_R = 14,87 min), e também para alguns dos picos não identificados (t_R = 4,57; 11,55; 15,55 e 19,33 min), porém apresentou o flavonóide isoquercetina (t_R = 18,68 min) como o constituinte majoritário (área relativa).

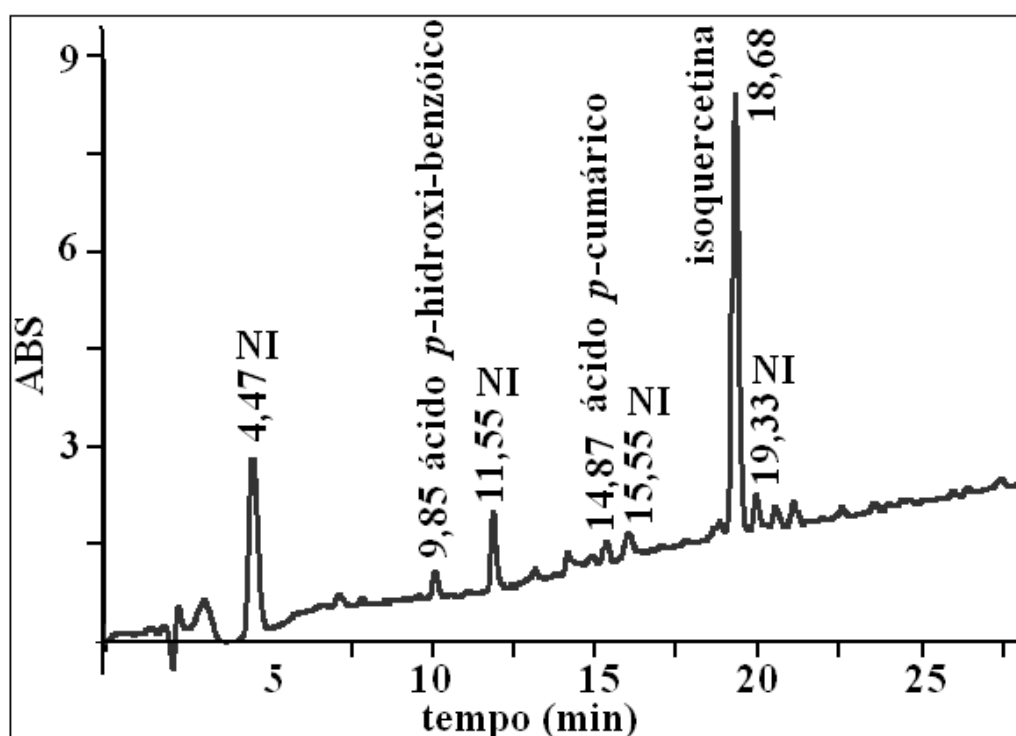
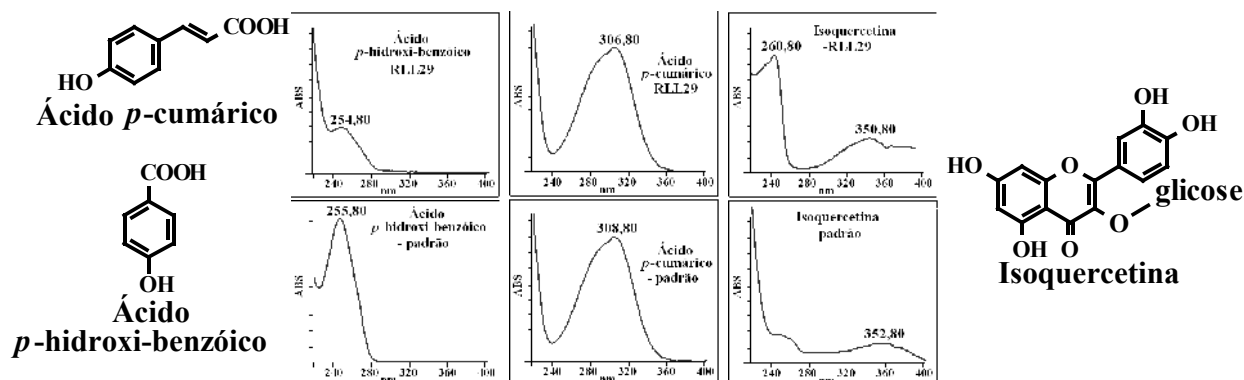


Figura 60. Análise da amostra **RLL29** (extraída com acetato de etila) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 µm), fluxo de 0,2 mL.min⁻¹, fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), 200-400 nm. NI – picos não identificados.

A amostra **RLL30** adquirida de um apiário localizado em Aguai-SP, em janeiro de 2008, apresentou no seu perfil cromatográfico os ácidos protocatecuico (t_R = 6,98 min) e *para*-hidroxi-benzóico (t_R = 9,80 min); e o flavonóide isoquercetina (t_R = 18,62 min). Os demais picos (t_R = 11,57; 14,40; 15,52; 19,30; 20,40 e 23,68 min) não puderam ser identificados quando comparados aos padrões. Das substâncias identificadas a isoquercetina foi o constituinte majoritário (área relativa).

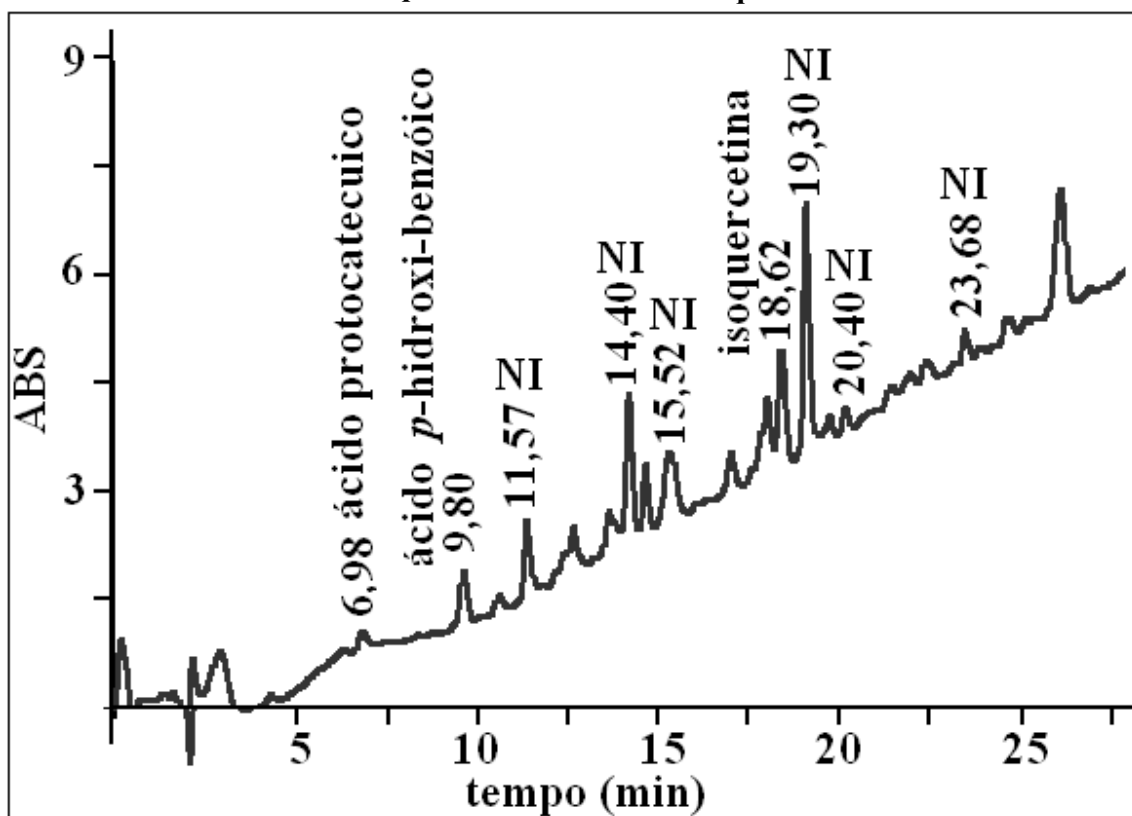
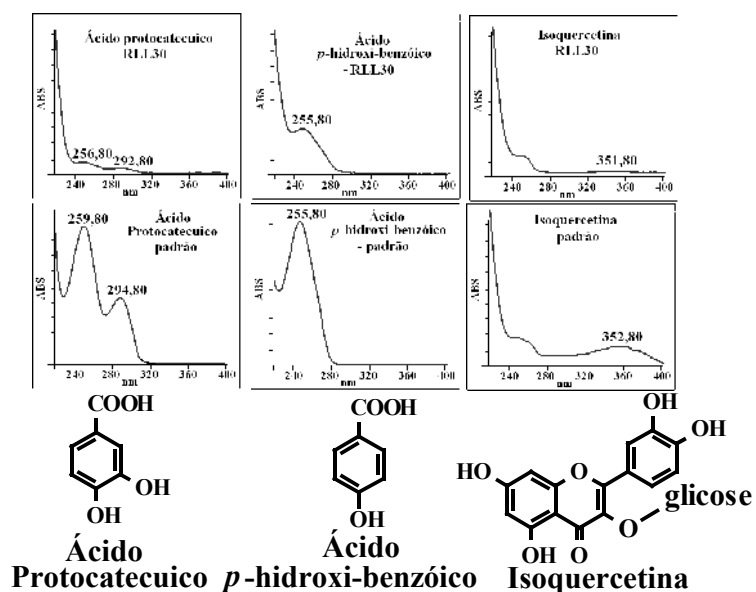


Figura 61. Análise da amostra **RLL30** (extraída com éter) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 μ m), fluxo de 0,2 mL.min⁻¹, fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), 200-400 nm. NI – picos não identificados.

A amostra **RLL31** foi adquirida de um apiário localizado em Bebedouro-SP, em novembro de 2005. Esta amostra também apresentou semelhança quanto aos ácidos presentes na **RLL30**, porém não apresentou flavonóide. Pela análise por CLAE-DAD foram identificados os ácidos fenólicos: protocatecuico ($t_R = 7,17$ min) e o *para*-hidroxi-benzóico ($t_R = 10,02$ min), ambos derivados do ácido benzóico. Os demais picos ($t_R = 4,70$; 11,85; 14,15; 19,92; 21,92 e 23,68 min) não puderam ser identificados quando comparados aos padrões identificados.

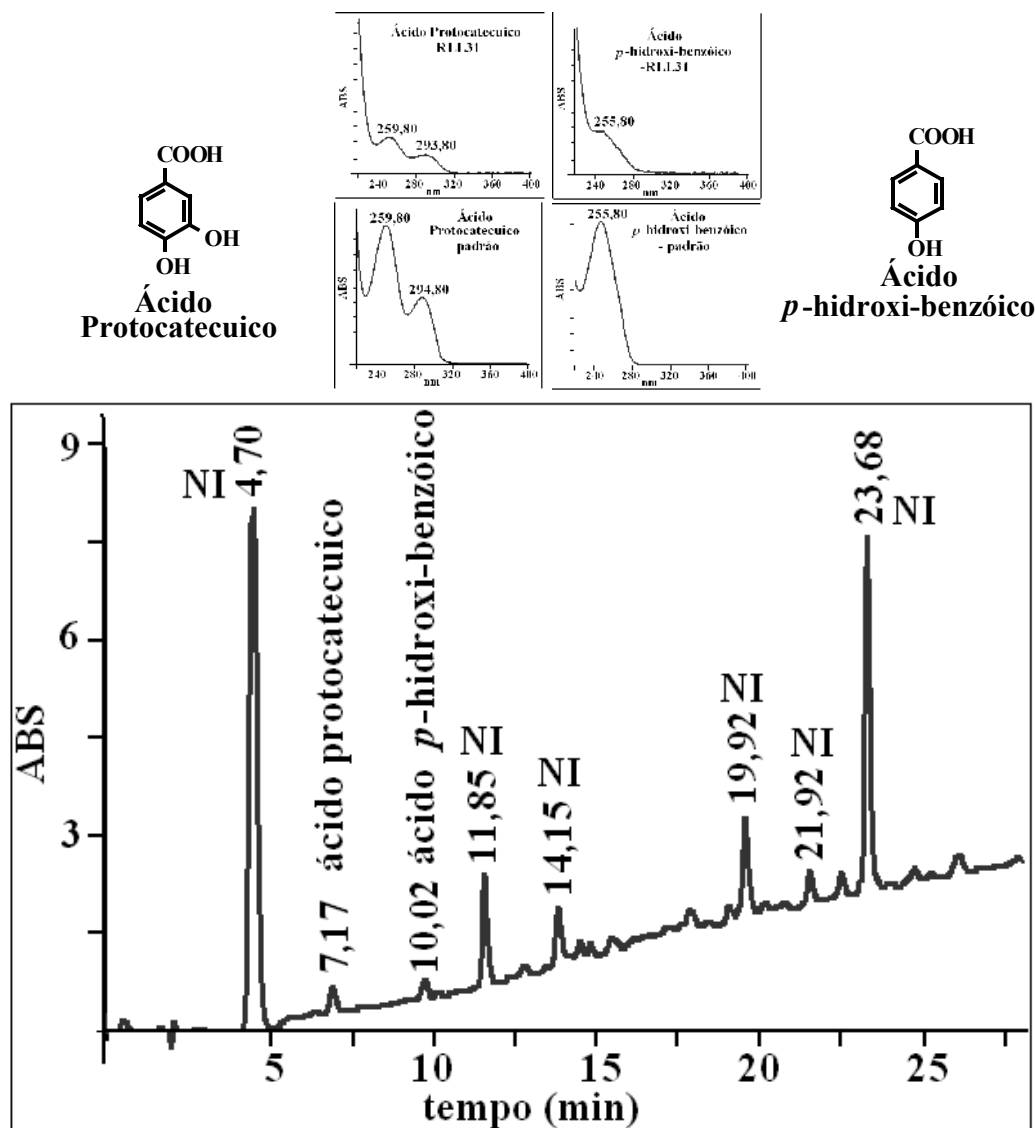


Figura 62. Análise da amostra **RLL31** (extraída com acetato de etila) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 μ m), fluxo de 0,2 mL.min⁻¹, fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), 200-400 nm. NI – picos não identificados.

A amostra **RLL32**, adquirida de um apiário localizado em Bebedouro-SP, em novembro de 2006, apresentou seu perfil cromatográfico semelhante ao da **RLL31**, onde foram identificados os ácidos protocatecuico ($t_R = 7,01$ min) e o *para*-hidroxi-benzóico ($t_R = 9,85$ min). Um número maior de picos não identificados ($t_R = 4,30$; 6,27; 11,48; 12,28; 13,08; 14,12; 14,88; 18,20; 19,28; 21,60; 23,08 e 26,47 min) apareceram no cromatograma.

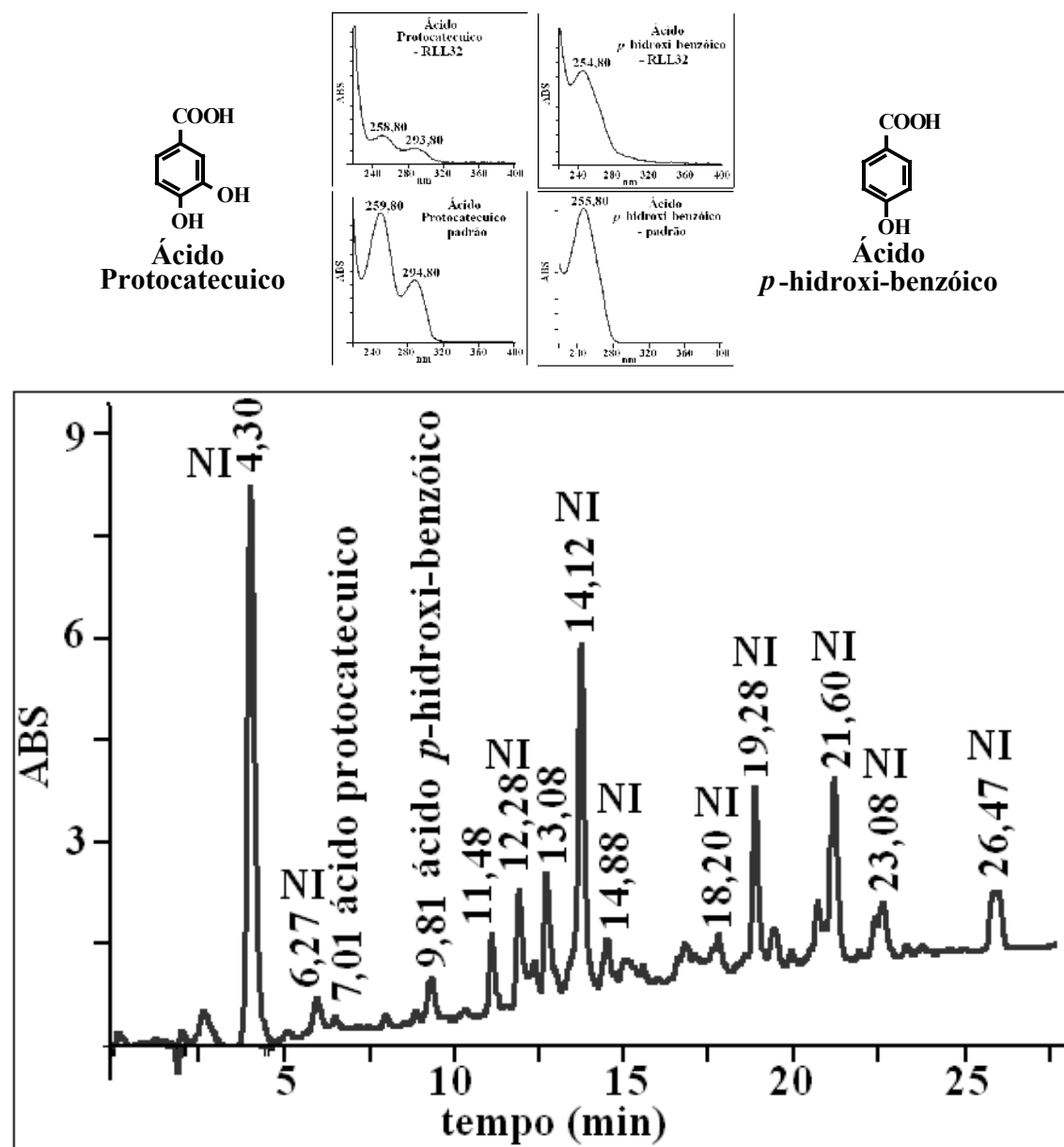


Figura 63. Análise da amostra **RLL32** (extraída com acetato de etila) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 μ m), fluxo de 0,2 mL.min⁻¹, fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), 200-400 nm. NI – picos não identificados.

A amostra **RLL40** (extrato etéreo) foi adquirida de um apiário localizado em Paraty-RJ, próximo da Mata Atlântica, em outubro de 2006. A análise cromatográfica não apresentou tantos picos não identificados como as anteriores. No seu perfil cromatográfico foram identificados os ácidos *para*-hidroxi-benzóico (t_R = 10,05 min), vanílico (t_R = 11,52 min), *para*-cumárico (t_R = 15,52 min) e cinâmico (t_R = 20,41 min). Além desses ácidos fenólicos, o flavonóide quercetina (t_R = 22,29 min) foi identificado como constituinte majoritário (área relativa). Um fato interessante observado quando da preparação dessa amostra, foi a coloração amarelo intensa que esse extrato etéreo apresentou, semelhante a coloração quercetina. Este extrato foi o que apresentou a maior massa (52,8 mg) em relação a 50 g de mel usado.

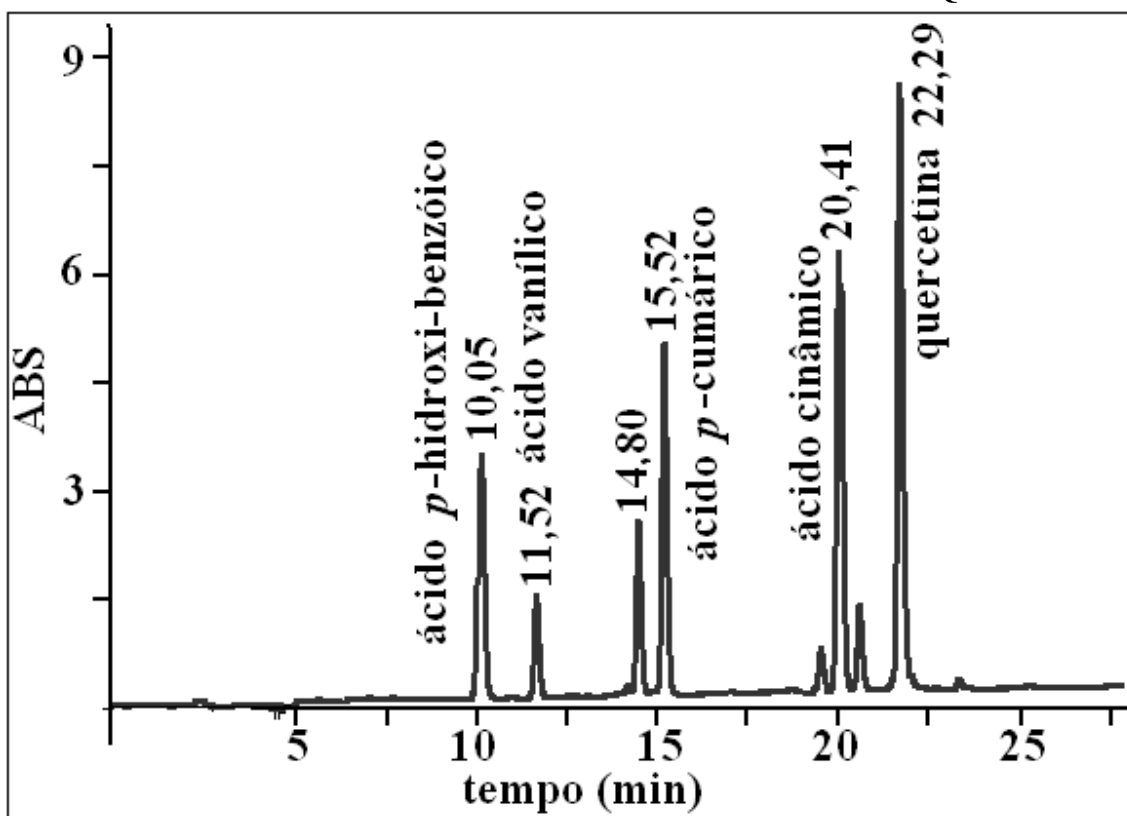
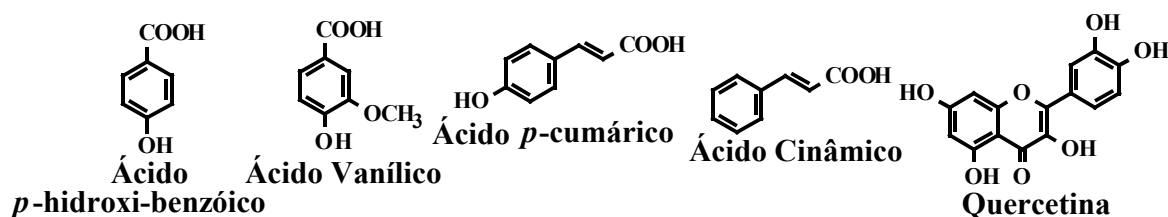
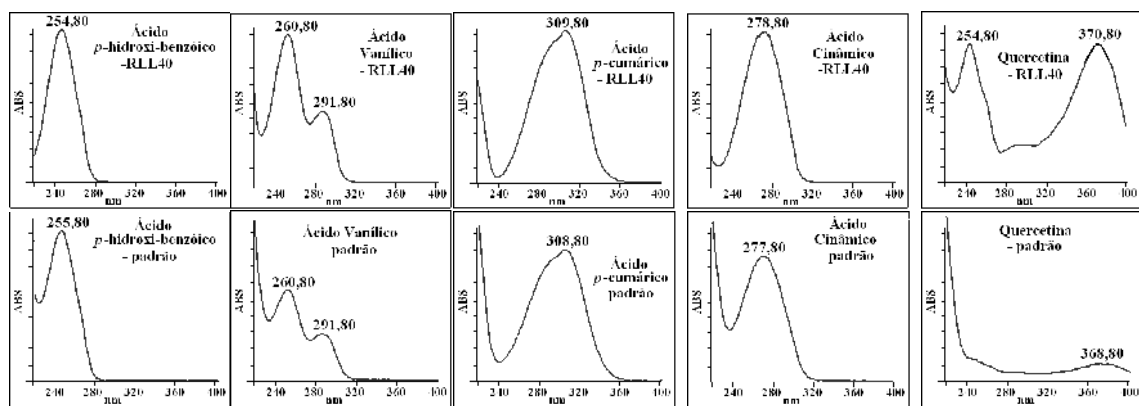


Figura 64. Análise da amostra **RLL40** (extraída com éter) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 μ m), fluxo de 0,2 mL.min⁻¹, fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), 200-400 nm.

A amostra **RLL41** foi adquirida em janeiro de 2008, na região rural da cidade de Aguaí-SP, grande produtora de laranja. Apresentou seu perfil cromatográfico semelhante às amostras **RLL28** e **RLL29**, porém com a ausência de flavonóides. Os ácidos fenólicos identificados foram os ácidos *para*-hidroxi-benzóico (t_R = 9,75 min) e o *para*-cumárico (t_R = 14,83 min). Os demais picos (t_R = 4,32; 11,57; 18,28; 19,38; 21,93; 23,83 e 23,55 min) não puderam ser identificados.

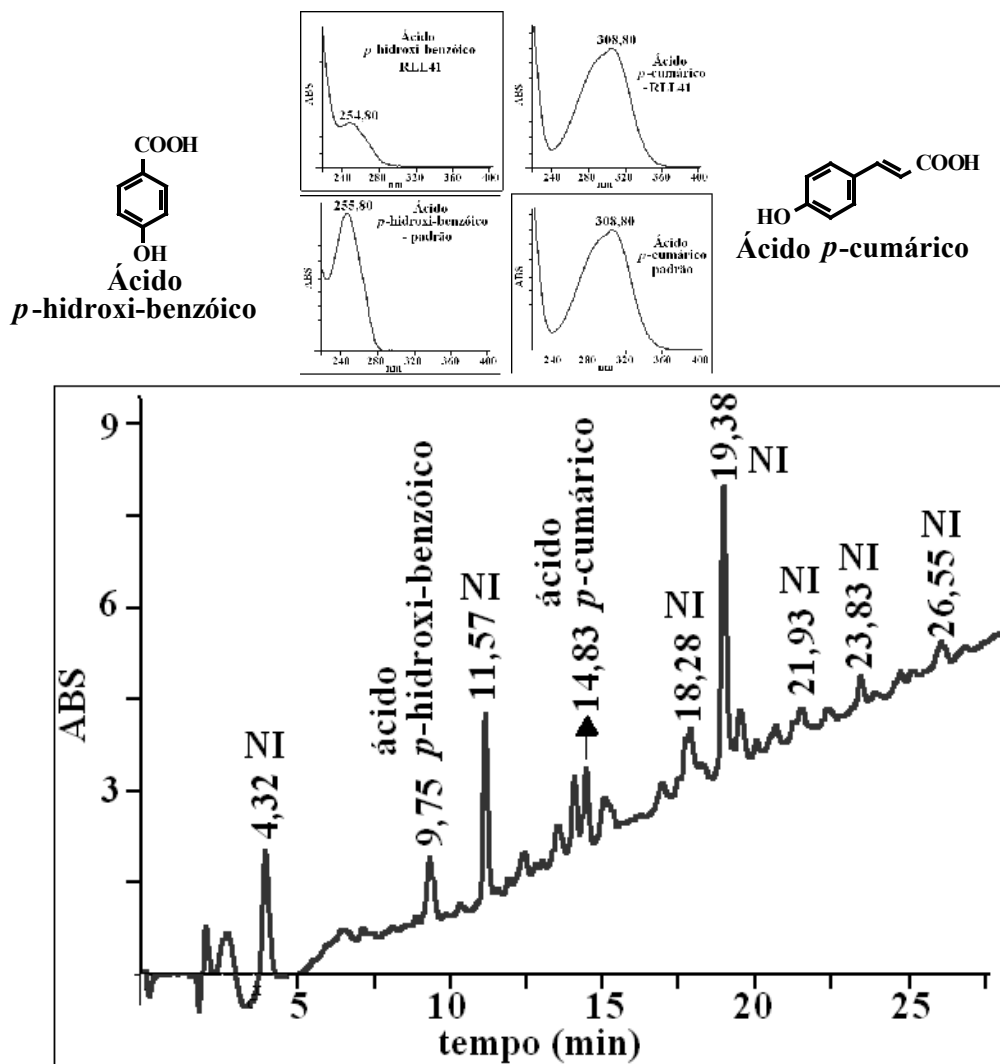


Figura 65. Análise da amostra **RLL41** (extraída com acetato de etila) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 μ m), fluxo de 0,2 mL.min⁻¹, fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), 200-400 nm. NI – picos não identificados.

Comparando as substâncias identificadas nas amostras de méis laranjeiras estudadas aqui, com aquelas estudadas anteriormente (LIANDA, 2004; Tabela 4, p. 38), foi possível observar a presença constante dos ácidos *para*-hidroxi-benzóico e *para*-cumárico, dentre

as substâncias identificadas, para a maioria dos casos. Isto pode sugerir o uso dessas substâncias como possíveis marcadores taxonômicos para mel de laranjeira. Neste trabalho foram observados a persistência dos picos não identificados com tempos de retenção por volta de 11,50 e 19,30 minutos, o que poderia sugerir a sua identificação através de outras técnicas (como por exemplo, CLAE-EM) ou a tentativa de isolar tais substâncias, e posteriormente, identificá-las usando técnicas espectrométricas (RMN, EM).

7.4.3 - Análises dos extratos dos méis de eucalipto

A seguir serão apresentados os resultados obtidos para o estudo dos perfis cromatográficos das três amostras de méis monoflorais de eucalipto, codificadas como **RLE34**, **RLE35** e **RLE36**.

O primeiro deles, o **RLE34** foi adquirido, em agosto de 2006, de um apiário localizado em Uberaba-MG. A análise do seu perfil cromatográfico permitiu verificar a presença de ácidos fenólicos semelhantes aos encontrados nos méis de laranjeira. As substâncias fenólicas derivadas do ácido benzóico que foram identificados: protocatecuico ($t_R = 7,20$ min) e o *para*-hidroxi-benzóico ($t_R = 10,15$ min); e ácido siríngico ($t_R = 12,28$ min), um derivado do ácido cinâmico, até aqui ainda não tinha sido identificado, foi o constituinte majoritário (área relativa). Outra informação interessante foi a identificação do flavonóide tricetina ($t_R = 21,68$ min) relatado pela primeira vez em méis brasileiros. Para a sua identificação foi necessário fazer a medida do fator de retenção (R_f) por CCDA em comparação com padrões de morina e tricetina ($R_f = 0,43$ da tricetina; $R_f = 0,48$ da morina), visto que apresentaram tempos de retenção e curvas de UV semelhantes. Alguns picos não puderam ser identificados, sendo alguns até coincidentes com os das amostras anteriores ($t_R = 4,67$; $14,55$; $15,70$; $18,53$ e $20,05$ min).

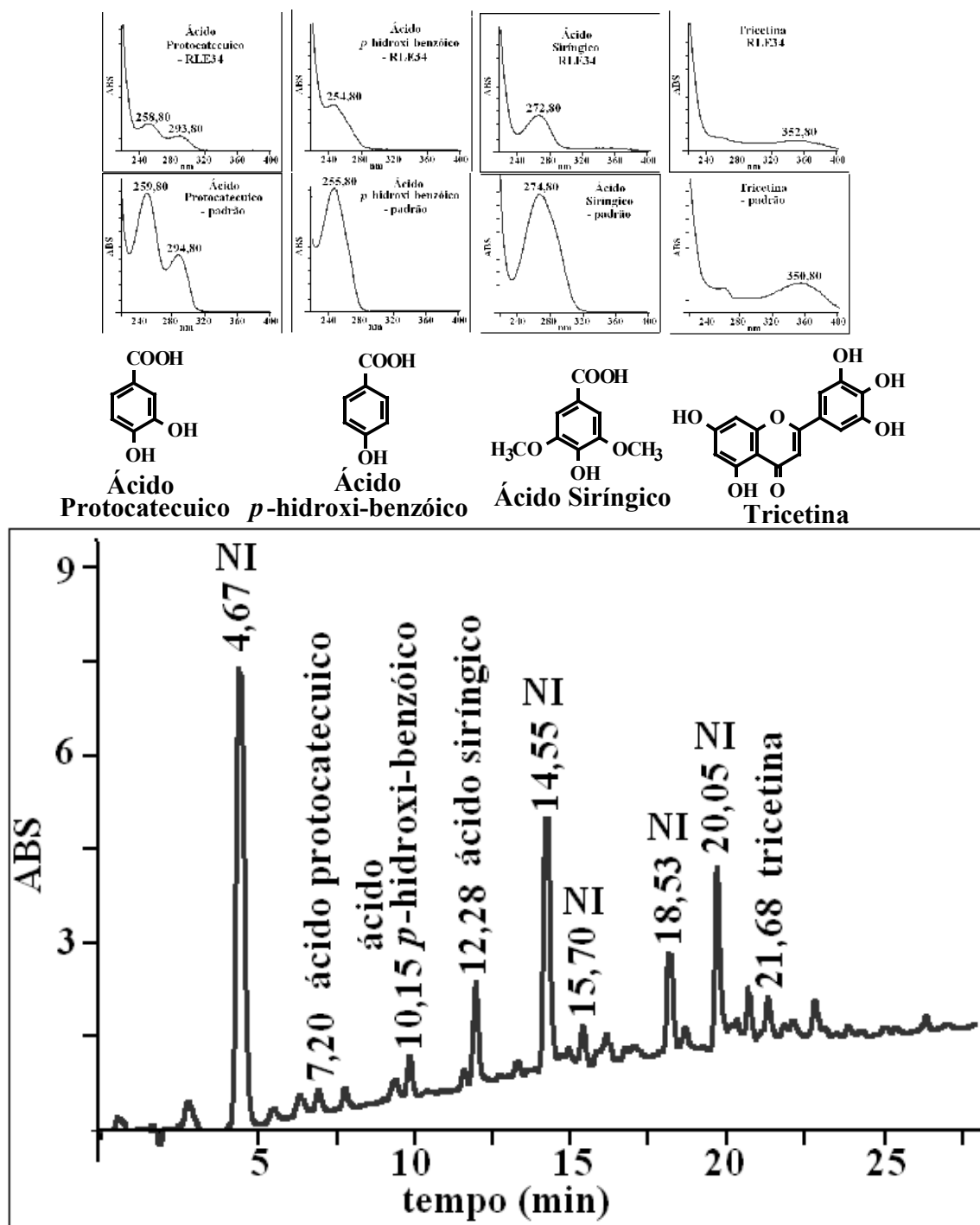


Figura 66. Análise da amostra **RLE34** (extraída com acetato de etila) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 μ m), fluxo de 0,2 mL.min⁻¹, fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), 200-400 nm. NI – picos não identificados.

A amostra **RLE35** foi adquirida, em abril de 2007, de um apiário localizado em São Carlos (SP) e apresentou os ácidos protocatecuico ($t_R = 7,00$ min), *para*-hidroxi-benzóico ($t_R = 9,85$ min) e siríngico ($t_R = 12,75$ min), os mesmos ácidos fenólicos encontrados na amostra **RLE34**, além de apresentar um quarto ácido derivado do ácido benzóico, o ácido vanílico ($t_R = 11,55$ min), porém não apresentou flavonóides. Alguns picos não puderam ser identificados ($t_R = 13,87$; 15,65; 17,80; 20,45; 22,68 e 24,32 min).

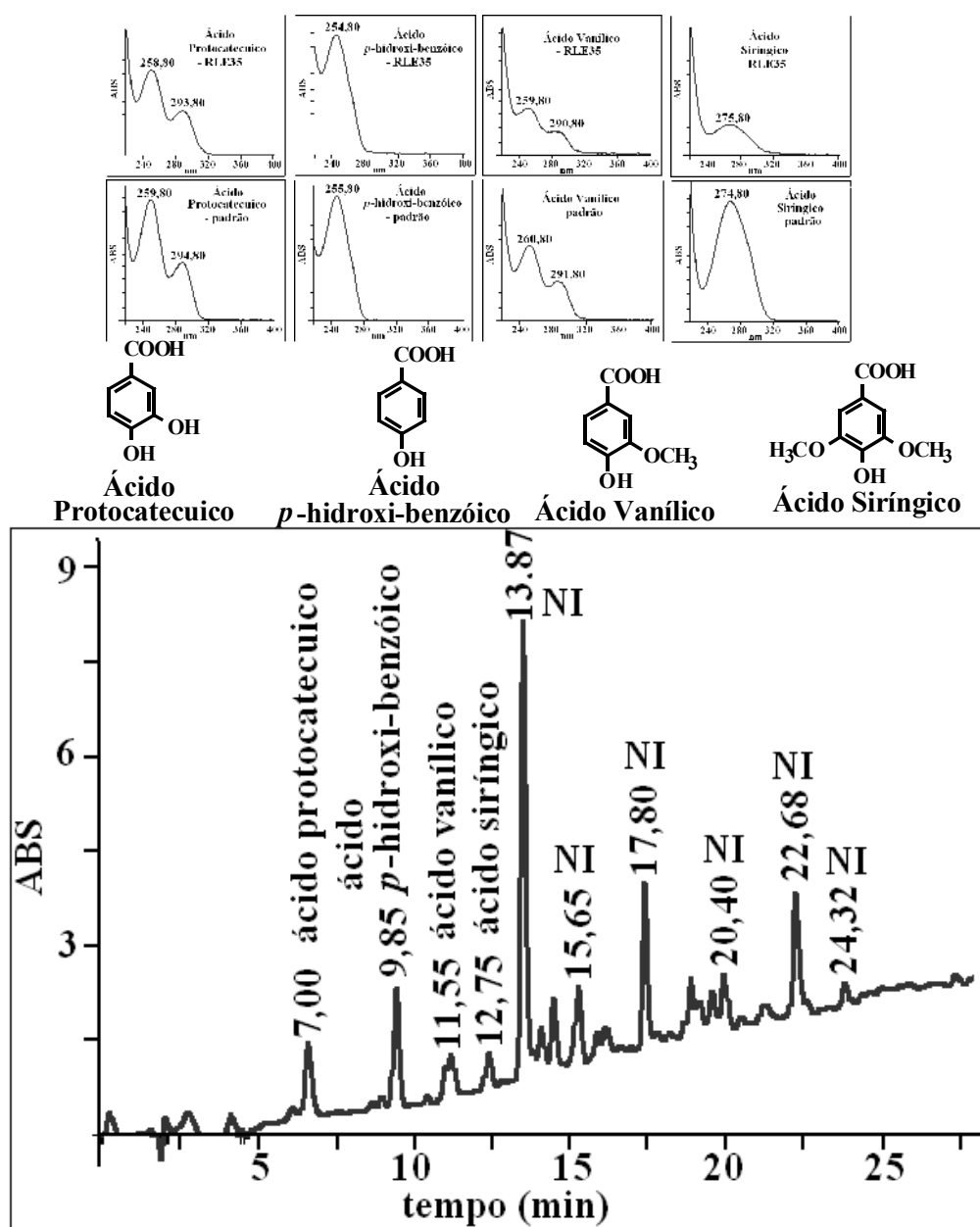


Figura 67. Análise da amostra **RLE35** (extraída com éter) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 μ m), fluxo de 0,2 mL.min⁻¹, fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), 200-400 nm. NI – picos não identificados.

A amostra **RLE36** adquirida de um entreposto em Campinas-SP apresentou seu perfil cromatográfico semelhante às amostras **RLE34** e **RLE35** pelas presenças dos ácidos protocatecuico ($t_R = 7,17$ min) e do siringico ($t_R = 12,95$ min), porém foi a única amostra que apresentou o ácido cinâmico ($t_R = 20,15$ min). Igualmente a amostra **RLE34** apresentou o flavonóide tricetina ($t_R = 21,17$ min), porém em maior proporção (área relativa). Há diversos picos não identificados ($t_R = 2,98; 4,68; 10,02; 11,58; 14,02; 15,82; 17,95$ e $22,83$ min). Apesar das poucas amostras analisadas, talvez possa haver um indício do ácido siringico como o possível marcador químico para méis de eucalipto.

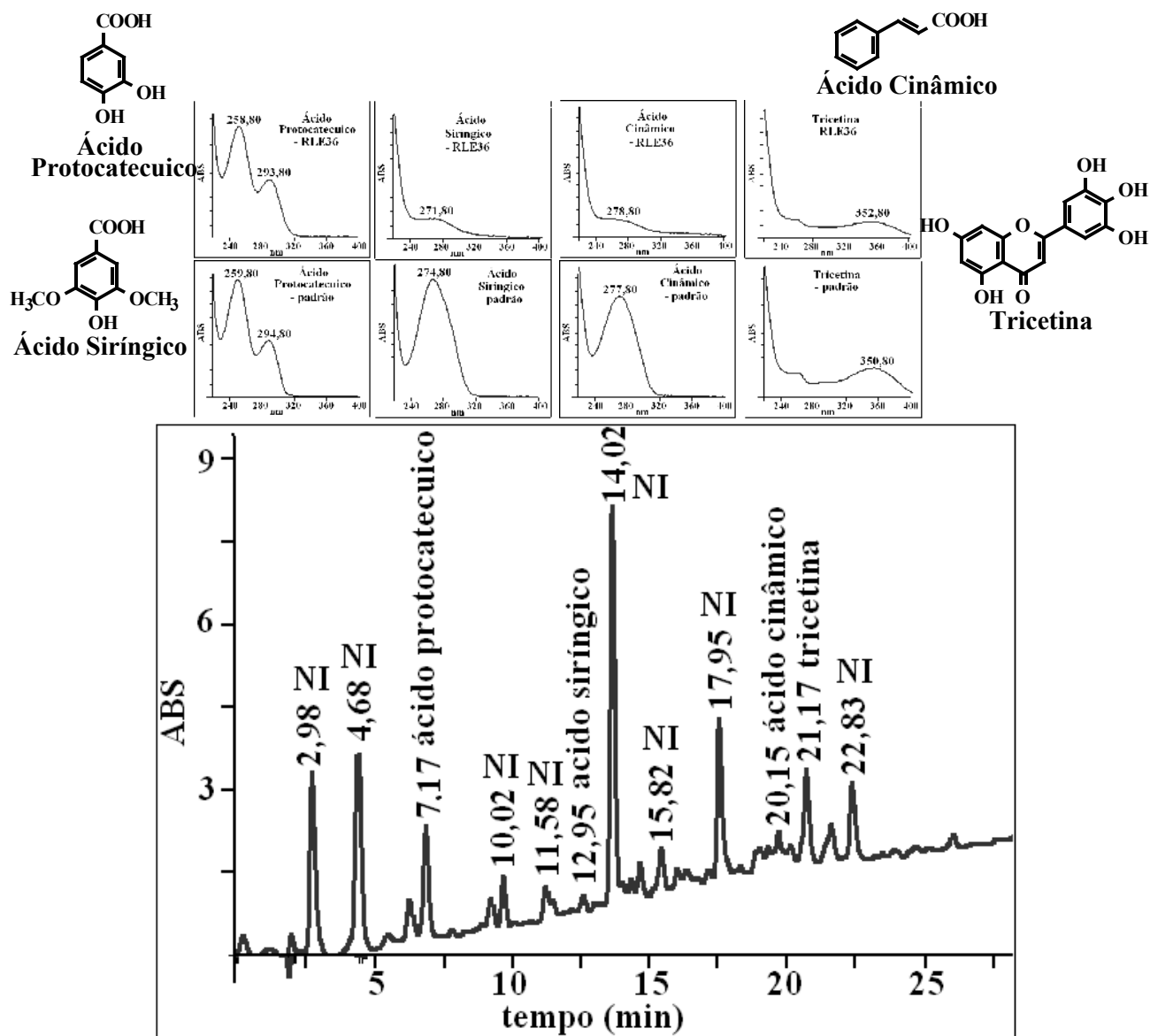


Figura 68. Análise da amostra **RLE36** (extraída com acetato de etila) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (15 cm x 2 mm x 3 μ m), fluxo de 0,2 mL.min⁻¹, fase móvel metanol: acetonitrila: ácido acético (89,1: 9,9: 1 - solvente A) e água: ácido acético (99:1 - solvente B), 200-400 nm. NI – picos não identificados.

A partir das análises dos perfis cromatográficos dos três tipos de méis estudados (silvestre, de laranjeira e de eucalipto) foi possível observar que existiu uma grande variedade, com pouca repetibilidade, para as substâncias fenólicas identificadas nas amostras de méis silvestres. Este fato poderá dificultar a indicação de um marcador químico que possa auxiliar na caracterização da origem botânica. Essa diversidade pode ser considerada coerente com méis heteroflorais, que por definição são oriundos de florada mista sem predominância botânica, porém foi os méis silvestres selecionados para este estudo foram de origem provável da Mata Atlântica. Em geral as massas obtidas para os extratos dos méis heteroflorais (~35 mg) foram superiores aquelas dos méis monoflorais (de laranjeira ~15 mg e de eucalipto ~20 mg).

As análises qualitativas para os perfis cromatográficos das amostras dos méis silvestres (**RLS21** e **RLS23**) mostraram a presença de ácidos fenólicos como os principais constituintes químicos encontrados nesses méis. Este fato pode corroborar para os maiores teores de fenóis totais encontrados para esses méis (87,2 e 54,0 mg/100 g de mel, respectivamente). Essas amostras, porém, apresentaram baixos teores de flavonóides totais (1,6 e 4,27 mg/100 g de mel, respectivamente), o que foi confirmado pelo pobre perfil para flavonóides encontrados nas análises por CLAE-DAD.

Os méis silvestres de origem provável da Mata Atlântica apresentaram ácidos fenólicos derivados do ácido benzóico, quanto do ácido cinâmico, incluindo o próprio ácido cinâmico, além de diversos flavonóides. Dentre os flavonóides identificados, o canferol foi encontrado somente na amostra de mel silvestre **RLS24**, única amostra coletada no verão de 2005 (segundo informe do apicultor). Os ácidos protocatecuico e *para*-hidroxi-benzóico, ambos derivados do ácido benzóico, também estiveram presentes nessa amostra.

A presença do ácido protocatecuico, mesmo em pequenas proporções (área relativa) pode ter sido o fato que contribuiu para melhor atividade antioxidante obtida para o extrato **RLS21** ($CE_{50} = 29,59 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em comparação ao extrato **RLS23** ($CE_{50} = 30,60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) que não apresentou esse ácido, apesar de ter apresentado o melhor teor de flavonóides totais (4,27 mg/100 g de mel).

Não foi feita quantificação das substâncias presentes, porém foi possível comparar áreas relativas dos picos em busca de informações. Para o ácido protocatecuico, os picos com áreas mais proeminentes estiveram presentes nas amostras de méis de eucalipto, principalmente as **RLE35** e **RLE36**, apesar da sua grande distribuição entre todas as amostras.

Uma outra substância que apareceu somente nos méis silvestres, especificamente das amostras **RLS21** e **RLS23**, foi o ácido *para*-metoxi-benzóico, ambas coletadas na Mata Atlântica, segundo informações dos apicultores (Itararé e Jquitiba, SP, respectivamente) no verão de 2004. Outro mel silvestre (**RLS12**) coletado nesta mesma estação, porém avaliado em trabalho anterior (LIANDA, 2004) apresentou juntamente com essa substância, o ácido *para*-cumárico. Essas informações talvez possam ser consideradas aleatórias ou decorrentes de fatores ambientais ou climáticos, assim como a presença do canferol na amostra **RLS24**, que foi a única coletada no verão de 2005.

Dentre as substâncias fenólicas padrões selecionados para este estudo, os ácido gálico e o cafeico não estiveram presentes em nenhuma das amostras analisadas. E dentre os flavonóides, a rutina e a naringenina, também não foram identificadas. Esta foi a

primeira fez que uma flavanona (naringenina) foi utilizada como padrão. A sua presença, no entanto, não parece ser comum em méis brasileiros, já que é oriunda da única própolis disponível na Europa (o álamo) e, portanto aparece com frequência nos méis europeus, bem como em regiões como a Austrália que importou álamo, pois não havia própolis nativa (MARCUCCI *et al.*, 2001). Essa fonte de própolis também existe no Brasil, mas não como única; há própolis disponível para a coleta das abelhas de diversas procedências no Brasil. Dos outros três padrões citados, a rutina e o ácido gálico já haviam sido identificados em méis brasileiros em trabalhos anteriores (DA SILVA, 2004; LIANDA, 2004; MONTAGNI, 2005), o que não ocorreu com o ácido cafeico.

Muitos picos presentes nos cromatogramas não puderam ser identificados por não terem os tempos de retenção e seus espectros no UV relacionados a nenhum dos padrões estudados. O pico com tempo de retenção aproximado de 4,50 minutos apareceu em todas as amostras de méis de eucalipto e na maioria dos méis de laranjeira, não despertando nenhum interesse como marcador químico de origem botânica. Alguns surgiram apenas nas amostras de méis de laranjeira, porém em sua minoria, também podendo ser descartados sob o ponto de vista de marcadores, como por exemplo os de tempos de retenção aproximados em 21 e 26,60 minutos. Durante a discussão dos cromatogramas dos méis laranjeiras, foram evidenciados os picos não identificados com tempos de retenção aproximados de 11,5 e 19,3 minutos. Adiante se pode observar a presença do pico, cujo tempo de retenção foi de 11,5 minutos, também em duas das amostras de méis de eucalipto, retirando a possibilidade dessa substância estar relacionada com a origem botânica dos méis de laranjeira. Já o pico com tempo de retenção por volta de 19,3 minutos apareceu em diversas amostras de méis laranjeiras e em apenas uma amostra de mel silvestre. Para que essa substância possa tornar-se um possível marcador químico da florada de méis de laranjeira, seria necessário primeiro identificá-la, talvez utilizando detector massa/massa.

Os méis de laranjeira apresentaram uma menor variedade de substâncias fenólicas em suas composições químicas, salvo amostras coletadas próximas da região da Mata Atlântica, segundo informações do apicultor. Na avaliação desses méis, foi observada, dentre as substâncias que puderam ser identificadas, a presença freqüente de um ácido fenólico derivado do ácido cinâmico, o ácido *para*-cumárico. Considerando todas as amostras de méis de laranjeira estudadas, inclusive as do trabalho anterior (LIANDA, 2004), essa substância esteve presente em cerca de 70% das amostras estudadas. Essa é uma preciosa informação, que pode levar à indicação dessa substância como um possível marcador químico de origem floral, mesmo que não seja o único no caso de se identificar o pico com tempo de retenção de 19,3 minutos como outro marcador.

Embora apenas três amostras de méis de eucalipto tenham sido estudadas, os dados obtidos pareceram bastante interessantes. Em duas (**RLE34** e **RLE36**), das três amostras analisadas, a tricetina foi o único flavonóide identificado, enquanto o ácido siríngico esteve presente nas três amostras. Essas duas substâncias não estiveram presentes nas amostras de méis de eucalipto estudadas anteriormente (DA SILVA, 2004). Sendo assim, para que o ácido siríngico possa ser indicado como marcador químico de origem botânica desses méis, será necessário a avaliação de maior número de amostras.

Outra informação bastante interessante foi que, apesar dos flavonóides não serem encontrados usualmente nos méis brasileiros, pode-se observar a presença freqüente dos flavonóides morina e quercetina nas amostras de méis de origem provável da Mata

Atlântica. Estas substâncias poderão vir a serem indicadas como marcadores químicos de origem geográfica desses méis. Esse dado levou em consideração todas as amostras estudadas aqui e nos trabalhos anteriores (LIANDA, 2004; LIANDA & CASTRO, 2008).

Abaixo está apresentada a Tabela 28 que relaciona as principais substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestres, de laranjeira e de eucalipto estudados nesse trabalho. E na Tabela 29 as substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestres e de laranjeira em estudo anterior (LIANDA, 2004). Em cores diferentes estão as substâncias que possivelmente poderão ser indicadas como marcadores químicos de origem botânica e/ou geográfica dos méis brasileiros.

Tabela 28. Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestres, de laranjeira e de eucalipto neste trabalho.

Amostras de méis	Substâncias Fenólicas identificadas por CLAE-DAD
Silvestres	
RLS21	Ácidos: protocatecuico, <i>para</i> -hidroxi-benzóico, <i>para</i> -cumárico e <i>para</i> -metoxi-benzóico Flavonóide: quercetina
RLS23	Ácidos: <i>para</i> -hidroxi-benzóico, vanílico, <i>para</i> -cumárico, e <i>para</i> -metoxi-benzóico *Flavonóides: morina e isoquercetina
RLS24	Ácidos: protocatecuico, <i>para</i> -hidroxi-benzóico e cinâmico Flavonóides: canferol e *isoquercetina
Laranjeiras	
RLL28	Ácidos: <i>para</i> -hidroxi-benzóico e <i>para</i>-cumárico
RLL29	Ácidos: <i>para</i> -hidroxi-benzóico e <i>para</i>-cumárico *Flavonóide: isoquercetina
RLL30	Ácidos: protocatecuico e <i>para</i> -hidroxi-benzóico *Flavonóide: isoquercetina
RLL31	Ácidos: protocatecuico e <i>para</i> -hidroxi-benzóico
RLL32	Ácidos: protocatecuico e <i>para</i> -hidroxi-benzóico
RLL40	Ácidos: <i>para</i> -hidroxi-benzóico, vanílico, <i>para</i>-cumárico e cinâmico Flavonóide: quercetina
RLL41	Ácidos: <i>para</i> -hidroxi-benzóico e <i>para</i>-cumárico
Eucaliptos	
RLE34	Ácidos: protocatecuico, <i>para</i> -hidroxi-benzóico e siríngico *Flavonóide: tricetina
RLE35	Ácidos: protocatecuico, <i>para</i> -hidroxi-benzóico, vanílico e siríngico
RLE36	Ácidos: protocatecuico, siríngico e cinâmico *Flavonóide: tricetina

* confirmado por CCDA

Tabela 29. Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestres e de laranjeira em trabalho anterior (LIANDA, 2004).

Amostras de méis	Substâncias Fenólicas identificadas por CLAE-DAD
Silvestres	
RLS02	Ácidos: <i>para</i> -metoxi-benzóico e <i>para</i> -metoxicinâmico
RLS05	Ácidos: <i>para</i> -hidroxi-benzóico
RLS06	Ácido gálico
RLS10	Ácidos: gálico, <i>para</i> -hidroxi-benzóico, vanílico, sinápico e <i>para</i> -metoxi-cinâmico Flavonóide: morina
RLS12	Ácidos: protocatecuico, <i>para</i> -cumárico, e <i>para</i> -metoxi-cinâmico Flavonóides: morina e quercetina
Laranjeiras	
RLL03	Ácidos: <i>para</i> -hidroxi-benzóico, vanílico e <i>para</i> -cumárico
RLL15	Ácidos: gálico, vanílico e sinápico Flavonóides: quercetina, *rutina
RLL16	Ácidos: protocatecuico, <i>para</i> -cumárico, sinápico, cinâmico e <i>para</i> -metoxi-cinâmico Flavonóides: morina e quercetina
RLL18	Ácidos: protocatecuico, <i>para</i> -cumárico e <i>para</i> -metoxi-benzóico
RLL19	Ácidos: protocatecuico, siríngico, <i>para</i> -cumárico, cinâmico e <i>para</i> -metoxi-cinâmico Flavonóides: morina e quercetina
RLL20	Ácidos: protocatecuico e <i>para</i> -cumárico Flavonóides: morina e quercetina

* confirmado por CCDA

8 – CONCLUSÕES

A análise do perfil cromatográfico para os méis silvestres e de laranjeira obtida em trabalho anterior (LIANDA, 2004) permitiu selecionar as seguintes substâncias fenólicas: ácidos gálico, protocatecuico e *para*-cumárico, quercetina, morina e rutina como padrões para serem avaliadas quanto aos seus potenciais antioxidante frente ao DPPH.

Na avaliação da atividade sequestradora de radical, empregando o radical livre DPPH, o extrato do mel silvestre (**RLS10**) foi o que demonstrou atividade antioxidante mais elevada ($CE_{50} = 6,17 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) quando comparado aos demais, e apresentou o ácido gálico como constituinte majoritário, além da morina. (LIANDA, 2004).

Para os méis de laranjeira o melhor resultado da atividade antioxidante foi obtido para amostra RLL18 ($CE_{50} = 9,74 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), que apresentou o ácido protocatecuico como constituinte majoritário (LIANDA, 2004). A amostra RLL03 ($CE_{50} = 52,87 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) apresentou a menor atividade, podendo este fato estar relacionado as presenças dos ácidos *para*-hidroxi-benzóico, vanílico e *para*-cumárico em baixas proporções encontrados na sua matriz, e que não favorecem a formação de uma *orto*-quinona, para estabilizar o radical fenoxila formado quando da doação de um radical hidrogênio ao radical DPPH.

Todas as amostras dos extratos dos méis apresentaram atividade antioxidante inferiores às dos controles. Esses resultados podem contribuir para avaliação dos efeitos antioxidantes *in vitro* dos méis. Entretanto maiores estudos devem ser feitos para elucidar o mecanismo de ação e a biodisponibilidade das substâncias fenólicas presentes.

Os teores de fenóis totais mostraram-se superiores para os méis heteroflorais (silvestres) em comparação com os homoflorais (laranjeiras). Destacando-se os méis **RLS10** (78,2 mg/100 g de mel) e **RLL18** (53,2 mg/100 g de mel) que apresentaram os maiores teores de fenóis totais, e apresentam importante atividade antioxidante, em sistemas contendo radical livre (DPPH).

Os estudos realizados com as diferentes amostras de méis demonstraram que o conteúdo de compostos fenólicos foi mais elevado nos méis silvestres, o que explicaria a maior ação antioxidante, demonstrada pela atividade captadora de radical (CE_{50}), ter sido observada para essas amostras. Isto poderia fundamentar seu uso como fitoterápico e/ou alimento funcional.

Os teores de flavonóides totais não foram tão significativos quanto de fenólicos para os méis brasileiros, sugerindo que nos méis brasileiros os ácidos fenólicos são bem mais abundantes que os flavonóides. As amostras RLS21 (1,6 mg/100 g de mel) e RLS23 (4,27 mg/100 g de mel) foram as que apresentaram os valores mais expressivos. Os méis laranjeiras RLL15, RLL16 e RLL19, oriundas da cidade de Botucatu-SP, apresentaram seus valores semelhantes.

Finalmente, quanto maior a concentração de fenóis totais tanto maior a atividade antioxidante; mas o mesmo não se pode dizer com respeito à concentração de flavonóides.

Os resultados obtidos indicaram que existe uma grande variação no perfil dos compostos fenólicos nos diversos tipos de méis analisados.

A análise do perfil cromatográfico associado ao estudo dos espectros de ultravioleta obtidos pelo detector de arranjo de fotodiodos para os méis permitiu identificar os ácidos

protocatecuico, *para*-hidroxi-benzóico e *para*-cumárico como os mais representativos, e a isoquercetina encontrada pela primeira vez.

Os ácidos protocatecuico e *para*-hidroxi-benzóico estiveram presentes em quase todas as amostras de méis estudadas nesse trabalho (silvestres, de laranjeira e de eucalipto), e o ácido *para*-cumárico esteve presente em diversas amostras de méis de laranjeira, inclusive nas amostras estudadas anteriormente (LIANDA, 2004). Essa é uma preciosa informação, que pode levar à indicação dessa substância como um possível marcador químico de origem floral.

Para os méis silvestres foram identificados os ácidos protocatecuico, *para*-hidroxi-benzóico, vanílico, *para*-cumárico, *para*-metoxi-benzóico e cinâmico, além dos flavonóides morina, quercetina, canferol e isoquercetina. Não apresentou, porém, nenhuma substância que pudesse ser indicada como marcador químico de origem botânica, devido a grande variedade e baixa frequência das substâncias encontradas. A isoquercetina e o canferol foram relatados pela primeira vez em mel brasileiro, sendo que o canferol só em uma única amostra (RLS24).

Os flavonóides, morina e a quercetina, foram que estiveram presentes em méis brasileiros de origem provável da Mata Atlântica, tanto neste trabalho quanto no anterior (LIANDA, 2004; LIANDA & CASTRO, 2008). Essas duas substâncias poderão vir a serem considerados marcadores químicos para caracterização de origem geográfica, visto que a Mata Atlântica está presente apenas em nosso país.

Os méis de eucalipto estudados fornecem dados interessantes, embora poucas amostras tenham sido avaliadas. Em duas, das três amostras analisadas a tricetina foi o flavonóide identificado, enquanto o ácido siríngico apareceu nas três amostras. Assim, essas duas substâncias poderão vir a ser útil como marcadores químicos de origem botânica desses méis, fazendo-se necessário a avaliação de mais amostras.

9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, M. R.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y.; NAKAMURA, J.; MATSUKA, M.; ZHU, F.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry* 2007, 101, 1383–1392.

ALJADI, A.M. & KAMARUDDIN, M.Y. Isolation and identification of phenolic acids in Malaysian honey with antibacterial properties. *Turk Journal Med. Science* 2003, 33, 229-236.

ALJADI, A.M. & KAMARUDDIN, M.Y. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry* 2004, 85, 513-518.

AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research* 2002, 22, 1041-1047.

AMIOT, M.J.; AUBERT, S.; GONNET, M.; TACCHINI, M. The phenolic compounds in honeys: preliminary study upon identification and family quantification. *Apidologie* 1989, 20 (2), 115-125.

ANDRADE, P.; FERRERES, F.E.; AMARAL, M.T. Analysis of Honey phenolic acids by HPLC, its application to honey botanical characterization. *Journal of Liquid Chromatography & Rel. Technology* 1997, 20 (14), 2281-2288.

ANJO, D.F.C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. *Journal Vasc. Br.* 2004, 3(2), 145-54.

ANKLAM, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry* 1998, 63(4), 549-562.

ARRABI P.R. Alimentos funcionais - aspectos gerais. *Nutrire* 2001, 21, 87-102.

ASAMI, D.K.; HONG, Y.J.; BARRETT, D.M.; MITCHELL, A.E. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using convencional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 2003, 51, 1237-1241.

AZEREDO, M.A.A.; AZEREDO, L.C.; DAMASCENO, J.G. Características físico-químicas dos méis do município de São Fidélis-RJ. *Ciência e Tecnologia de Alimento* 1999, 19(1), 3-7.

BANKOVA, V.S.; POPOV, S.S.; MAREKOV, N.L. High-performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. *Journal of Chromatography* 1982, 242, 135-143.

BARROS, M.B. Apicultura. Instituto de Zootecnia, D.N.P.A., Ministério da Agricultura, Série Monografias 1962, no 3. 257p.

BARTH, O.M. *O Pólen no Mel Brasileiro*, Luxor, 1989, Rio de Janeiro, 150 p.

BARTH, O.M. & CORÉ-GUEDES, J. Caracterização de méis de laranjeiras procedentes dos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo, Brasil, por meio da análise polínica. *LECTA, Bragança Paulista* 1999, 17 (1), 27-35.

BARTH, O.M. & DUTRA, V.M.L. Concentração de pólen em amostras de mel de abelhas monoflorais do Brasil. *Revista da Universidade de Guarulhos – Geociências*. Número especial: 2000, 173-176.

BARTH, O.M. Melissopalynology in Brazil: a review of pollen analysis of honeys, propolis and pollen loads of bees. *Scientia Agrícola* 2004, 61, 342-350.

BERAHIA, T.; CERRATI, C.; SABATIER, S.; AMIOT, M.J. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of flavonoids in honey. *Sciences Des Aliments* 1993, 13(1), 15-24.

BERETTA, G.; GRANATA, P.; FERRERO, M.; ORIOLI, M.; FACINO, R.M. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta* 2005, 533, 185-191.

BOGDANOV, S. *Antibacterial substances in honey*. Net. Bern, Switzerland: 1997. Disponível: http://www.apis.admin.ch/en/bienenprodukte/docs/honig/antibacterial_e.pdf>. Acesso em 15.01.2006.

BONAGA, G. & GIUMANINI, A.G. The volatile fraction of chestnut honey. *Journal Apicultural Research* 1986, 25, 113-120.

BORGES, V.C. Alimentos funcionais: prebióticos, probióticos, fitoquímicos e simbióticos. In: Waitzberg DL. Nutrição Enteral e Parenteral na Prática Clínica. São Paulo: Atheneu; 2001.

BOSI, G. & BATTAGLINI, A.G. Gas Chromatography analysis of free and protein amino acids in some unifloral honeys. *Journal Apicultural Research* 1978, 17, 152-166.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science & Technology (London)* 1995, 28(1), 25-30.

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa n. 11, de 20 de outubro de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. *Diário Oficial da União*, Brasília, n. 204, 23 out 2000. Seção 1, p.16.

BRAZ-FILHO, R. *Tese de Doutorado*. Estudo químico da *Apuleia leiocarpa*. PPGQO-UFRRJ. 1971. p. 372.

CAMARGO, R.C.R.; LOPES, M.T.R.; PEREIRA, F.M.; VILELA, S.L.O. Produção de Mel. Net. Piauí: julho de 2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/index.htm>>. Acesso em 05.09.2007.

CARAGAY, A.B. Cancer: preventive foods and ingredients. *Food Technology* 1992, 46, 65-68.

CARTLAND, B. The magic of honey. *Corgi Books* 1970, London, UK, 160p.

CASTILLO, M.H.; PERKINS, E.; CAMPBELL, J.H.; DOERR, R.; HASSET, J.M.; KANDASWAMI, C.; MIDDLETON, E. The effects of the bioflavonoid quercetin on squamous cell carcinoma of head and neck origin. *The American Journal of Surgery* 1989, 158, 351-355.

CHEN, L.; MEHTA, A.; BERENBAUM, M. ZANGERL, A.R.; ENGESETH, N.J. Honey from different floral sources as inhibitors of enzymatic browning in fruit and vegetable homogenates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000, 48, 4997-5000.

COOK, N.C. & SAMMAN, S. Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry* 1996, 7, 66-76.

COOPER, R.A.; MOLAN, P.C.; HARDING, K.G. Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. *Journal of the Royal Society of Medicine* 1999, 92(6), 283-285.

CORTOPASSI-LAURINO, M & RAMALHO, M. Pollen harvest by africanized *Apis mellifera* and *Trigona spinipes* in São Paulo: botanical and ecological views. *Apidologie* 1988, 19, 1-24.

CORTOPASSI-LAURINO, M. & GELLY, D.S. Analyse pollinique, propriétés physico-chimiques et action antibactérienne des mieis d'abellies africanisées *Apis mellifera* et de *Méliponinés* du Brésil. *Apidology* 1991, 22, 61-73.

CRANE, E. A book of honey. *Oxford University Press* 1980, Oxford, U.K., 198p.

CRANE, E. *O livro do mel*. Nobel, 1985, 2ed. São Paulo, 226p.

CRANE, E. The past and present importance of bee products to me. In: MIZRAHI; LENZKY. *Bee Products*. New York, Penum: 1996, 1-6.

CROZIER, A.; BURNS, J.; AZIZ, A.A.; STEWAR, A.J.; RABIASZ, H.S; JENKINS, G.I.; EDWARDS, C.A.; LEAN, M.E. Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: measurements and bioavailability. *Biological Research* 2000, 33(2), 1-6.

CUSHNIE, T.P.T. & LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2005, 26, 343–356.

DAG, A.; AFIK, O.; YESELSON, Y.; SCHAFFER, A.; SHAFIR, S. Physical, chemical and palynological characterization of avocado (*Persea americana* Mill.) honey in Israel. *International Journal of Food Science and Technology* 2006, 41, 387–394 387.

D'ARCY, B.; RINTOUL, G.; ROWLAND, C.Y.; BLACKMAN, A.J. Composition of Australian honey extractives. 1. Nor-isoprenoids, monoterpenes, and other natural volatiles from Blue Gum (*Eucalyptus leucoxylon*) and Yellow Box (*Eucalyptus melliodora*) honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997, 45, 1834-1843.

DA SILVA, R. F. *Dissertação de Mestrado*. Investigação de ácidos fenólicos em amostra de mel por cromatografia líquida de alta eficiência e sua aplicação na caracterização da origem floral. PPGQO-UFRJ. 2004, p.82.

DATTA, N.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; MARTOS, I.; FERRERES, F.; YAO, L.; SINGANUSONG, R. Flavonoids, Phenolic acids and Absciscic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. *Food Chemistry* 2003, 81, 159-168.

DE ANDRADE, C. A.; COSTA, C. K.; BORA, K.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; KERBER, V. A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. *Revista Brasileira de Farmacognosia (Brazilian Journal of Pharmacognosy)* 2007, 17(2), 231-235.

DEGÁSPARI, C. H. & WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acadêmica* 2004, 5, 33-40.

DE MARIA, C.A.B.; TRUGO, L.C.; COSTA, L.S.M.; ALBUQUERQUE, M.L.S.; QUINTEIRO, L.M.C.; BARTH, O.M. Determination of non-volatile compounds of different botanical origin Brazilian honeys. *Food Chemistry* 1999, 65, 347-352.

DE MARIA, C.A. & MOREIRA, R.F.A. Compostos voláteis em méis florais. *Química Nova* 2003, 26(1), 90-96.

DEWICK, P.M. Medicinal natural products: A biosynthetic approach. London: John Wiley, 1998, p. 466.

DEWICK, P.M. Medicinal natural products: A biosynthetic approach. London: John Wiley, 2nd ed., 2001, p. 507.

DEY, P.M. & HARBONE, J.B. Plant Biochemistry. London: Academic Press, 1997, p. 554.

DIMITROVA, B.; GEVRENOVA, R.; ANKLAM, E. Analysis of Phenolic Acids in Honeys of Different Floral Origin by Solid-phase Extraction and High-performance Liquid Chromatography. *Phytochemical Analysis* 2007, 18, 24–32.

DUTHIE, G.G.; DUTHIE, S.J.; KYLE, A.M. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutrition Research Reviews* 2000, 13(1), 79-106.

DUTRA, V.M.L. & BARTH, O.M. Análise palinológica de amostras de mel da região de Bananal (SP/RJ), Brasil. *Revista Universidade Guarulhos* 1997, Geociências II (nº especial), 174-183.

EFEM, S.E.E. Clinical observations on the wound healing properties of honey. *The British Journal of Surgery* 1988, 75(7), 679-681.

EFEM, S.E.E.; UDOH, K.T.; IWARA, C.I. The antimicrobial spectrum of honey and its clinical significance. *Infection* 1992, 20(4), 227-229.

ESTEVINHO, L.; PEREIRA, A.N.; MOREIRA, L.; DIAS, L.G.; PEREIRA, E. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology* 2008, 46, 3774-3779.

FELSNER, M.L. *Tese de Doutorado*. Caracterização de méis monoflorais de eucalipto e de laranja do Estado de São Paulo por técnicas termoanalíticas. Universidade de São Paulo-USP, São Paulo, 2001.

FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; GIL, M.I.; TOMÁS-LORENTE, F. An HPLC technique for flavonoid analysis in honey. *Journal Science Food Agric.* 1991, 56, 49-56.

FERRERES, F.; ORTIZ, A.; SILVA, C.; GARCIA-VIGUERA, C.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; TOMÁS-LORENTE, F. Flavonoids of “La Alcarria” honey – a study of their botanical origin. *Zeitschrift-fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 1992, 194, 139-143.

FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; TOMÁS-LORENTE, F. Hesperetin: a marker of the floral origin of citrus honey. *Journal Science Food Agric.* 1993, 61, 121-123.

FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; GINER, J.M. A comparative study of hesperetin and methyl anthranilate as markers of the floral origin of citrus honey. *Journal Science Food Agric.* 1994, 65, 371-372.

FERRERES, F.; BLAZQUEZ, M.A.; GIL, M.I.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Separation of honey flavonoids by micellar eletrokinetic capillary chromatography. *Journal Chromatography A* 1994a, 669(1/2), 268-274.

FERRERES, F.; ANDRADE, P.; GIL, M.I.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Floral nectar phenolics as biochemical markers for the botanical origin of heather honey. *Z. Lebensm Unters Forsch* 1996a, 202, 40-44.

FERRERES, F.; JUAN, T.; PEREZ-ARQUILLUE, C.; HERRERA-MARTEACHE, A.; GARCIA-VIGUERA, C.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Evaluation of pollen as a source of kaempferol in rosemary honey. *Journal Science Food Agric.* 1998, 77, 506-510.

FIORANI, M.; ACCORSI, A.; BLASA, M.; PIATTI, E. Flavonoids from Italian Multifloral Honeys Reduce the Extracellular Ferricyanide in Human Red Blood Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006, 54, 8328-8334.

GERMAN, B.; DILLARD, C.J. Phytochemicals: nutraceutical and human health. Reviews. *Journal Science Food Agric* 2000, 80, 1744-1756.

GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; GÓMEZ-ROMERO, M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006, 41, 1220–1234.

GUYOT, C.; SCHEIRMAN, V.; COLLIN, S. Floral origin markers of heather honeys: *Calluna vulgaris* and *Erica arborea*. *Food Chemistry* 1999, 64, 3-11.

HARBONE, J. & GREYER, R.J. Flavonoids and insects. In: ed. Lit. J.B. Harbone. *The Flavonoids: Advances in Research since 1986*. Edited by J.B. Harbone. London: Chapman & Hall, 1993, p. 589-618.

HARBORNE, J.B. The Flavonoids Advances in Research since 1986. *Ed. Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London-UK*, 1994.

HELDT, H.W. Plant Biochemistry and Molecular Biology. 1 ed. New York: Oxford University Press, 1997, p. 522.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; VENEMA, D.P. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1992, 40, 1591-1598.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. *Princípios Ativos de Plantas Superiores*. São Carlos: EdUFSCAR, 2003.

HOU, Y.C.; CHAO, P.D.L.; HO, H.J.; WEN, C.C.; HSIU S.L. Profound difference in pharmacokinetics between morin and its isomer quercetin in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2003, 55 (2), 199-203.

http://www.apicultura.com/index_sp.htm.

<http://www.apicultura2000.it/riviste/meditmelis.htm>

http://www.sebraern.com.br/apicultura/legislacao/inst_norm_11.doc Acessado em agosto de 2007.

<http://www.webbee.org.br/pesquisa/melissopalino.htm>

HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E.K. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002, 50, 1815-1821.

HUIDOBRO, J.F.; SUÁREZ-LUQUE, S.; MATO, I.; SIMAL-LOZANO, J.; SANCHO, M.T. Rapid determination of minority organic acids in honey by high-performance liquid chromatography. *Journal Chromatography A* 2002, 955, 207-214.

KAHOUN, D.; REZKOVÁ, S.; VESKRNOVÁ, K.; KRÁLOVSKÝ, J.; HOLCAPEK, M. Determination of phenolic compounds and hydroxymethylfurfural in meads using high performance liquid chromatography with coulometric-array and UV detection. *Journal of Chromatography A* 2008, 1202, 19–33.

KAMPA, M.; ALEXAKI, V.I.; NOTAS, G.; NIFLI, A.P.; NISTIKAKI, A.; HATZOGLU, A.; BAKOGEORGOU, E.; KOUIMTZOGLU, E.; BLEKAS, G.; BOSKOU, D.; GRAVANIS, A.; CASTANAS, E. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res* 2004, 6, R63-R74.

KANASHIRO, A. *Dissertação de Mestrado*. Efeito dos flavonóides no processo de produção de radicais de oxigênio por neutrófilos estimulado, 2001. Universidade de São Paulo – USP, FCFRP, Ribeirão Preto.

KANDASWAMI, C.; PERKINS, E.; DRZEWIECKI, G.; SOLONIUK, D.S.; MIDDLETON, E. Differential inhibition of proliferation of human squamous cell carcinoma, gliosarcoma and embryonic fibroblast-like lung cells in culture by plant flavonoids. *Anti-Cancer Drugs* 1992, 3, 525-530.

KAY, R.M. & STRASBERG, S.M. Origin, chemistry, physiological effects and clinical importance of dietary fibre. *Clin Inest Med* 1978, 1, 9-24.

KENJERIC, D.; MANDIC, M.L.; PRIMORAC, L.; CACIC, F. Flavonoid pattern of sage (*Salvia officinalis* L.) uniforal honey. *Food Chemistry* 2008, 110, 187–192.

KOMATSU, S.S.; MARCHINI, L.C.; MORETI, A.C.C.C. Análises físico-químicas de amostras de méis de flores silvestres, de eucalipto e de laranjeira, produzidos por *Apis mellifera* L., 1758 (HYMENOPTERA, APIDAE) no Estado de São Paulo. 2. Conteúdo de açúcares e de proteínas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 2002, Campinas, 22(2), 143-146.

KÜÇÜK, M.; KOLAYLI, S.; KARAOGLU, S.; ULUSOY, E.; BALTACI, C.; CANDAN, F. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry* 2007, 100, 526-534.

LENGLER, S. www.com.br/apicultura/pesquisas/inspeção_mel, 01.doc. 2004.

LIANDA, R.L.P. *Dissertação de Mestrado*. Caracterização de mel de *Apis mellifera* pelo seu perfil em substâncias fenólicas por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação da atividade biológica. PPGQO-UFRRJ. 2004, p.142.

LIANDA, R.L.P. & CASTRO, R.N. Isolamento e identificação da morina em mel brasileiro de *Apis mellifera*. *Química Nova* 2008, 31(6), 1472-1475.

LINDSTED, K. Chemical control of feeding behavior. *Comp. Biochem. Physiol.* 1971, 39A, 553-581.

LOUVEAUX, J.; MAURIZIO, A.; VORWOHL, G. Methods of melissopalynology. *Bee World* 1978, 59, 139–157.

MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. Systematic identification of flavonoids. New York (USA): Springer-Verlag 1970, p. 354.

MACHADO, F.M.S & SANTIAGO, V.R. Os benefícios do consumo de alimentos funcionais. In: Torres EAF, Machado FMS. Alimentos em questão: uma abordagem técnica para as dúvidas mais comuns. São Paulo: Ponto Crítico; 2001, p. 35-43.

MAGGI, L.; STELLA, R.; VALENTINI, M.T.G. Model compound sorption by the resins XAD-2, XAD-8 and diethylaminoethylcellulose. *Journal of Chromatography* 1989, 478, 225-230.

MANACH, C.; MORAND, C.; TEXIER, O. Quercetin metabolism in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin . *Journal of Nutrition* 1995, 125, 1911-1922.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 2004, 79, 727-747.

MANN, J. Secondary Metabolism, Claredon Press, Oxford, 8, 1987.

MARCANO, D. & MASAHISA, H. Fitoquímica orgânica. Caracas: Universidade Central de Venezuela, 1991, p. 81.

MARCHINI, L.C. Caracterização de amostras de méis de *Apis mellifera* (Hymenoptera-apidae) do Estado de São Paulo, baseada em aspectos físico-químicos e biológicos. Livre Docência, Piracicaba-SP, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. 2001.

MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; DANTAS, A.P.; VALENTE, P.H.M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology* 2001, 74, 105-112.

MARKHAN, K.R. Techniques of flavonoid identification. London: Academic Press, 1982, p. 113.

MARTOS, I.; COSSENTINI, M.; FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997, 45(8), 2824-2829.

MARTOS, I.; FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Identification of flavonoids markers for the botanical origin of *Eucaliptus* honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000, 48, 1498-1502.

MARTOS, I.; FERRERES, F.; YAO, L.H. ; D'ARCY, B.R.; CAFFIN, N.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Flavonoids in monospecific *Eucalyptus* honeys from Australia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000a, 48, 4744-4748.

McKIBBEN, J. & ENGESETH, N.J. Honey as a protective agent against lipid oxidation in ground turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002, 50, 592-595.

MEDA, A.; LAMIEN, C.E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOUUMA, O.G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkin Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry* 2005, 91(3), 571-577.

MENDES, B.A. & COELHO, E.M. Considerações sobre características de mel de abelhas – Análises e critérios de inspeção. *Informe Agropecuario* 1983, 9(106), 56-67.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; DOS SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research* 2001, 15(2), 127-130.

MERKEN, H.M. & GARY, R.B. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography : a Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000, 48(3), 577- 599.

MIORIN, P.L.; JUNIOR, N.C.L.; CUSTODIO, A.R.; BRETZ, W.A.; MARCUCCI, M.C. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology* 2003, 95, 913-920.

MITHEN R.F.; DEKKER M.; VERKERK R.; RABOT, S.; JOHSON, I.T. The nutritional significance and bioavailability of glucosinolates in human foods review. *Journal Science Food Agric* 2000, 80, 967-984.

MOLAN, P.C. The antibacterial activity of honey. The nature of the antibacterial activity. *Bee World* 1992, 73(1), 5-28.

MONTAGNI, S.M.S. *Dissertação de Mestrado*. Identificação de Substâncias Fenólicas em Mel e Pólen Apícola de Diferentes Origens Botânicas e Geográficas. PPGQO-UFRRJ. 2005, p. 140.

MOREIRA, R.F.A & DE MARIA, C.A.B. Glicídios no mel. *Quimica Nova* 2001, 24(4), 516-525.

MORETI, A.C.C.C. ; MARCHINI, L.C. ; SOUZA, V.C. ; RODRIGUES, R.R. Atlas do pólen de plantas apícolas. *Papel Virtual Editora*, Rio de Janeiro. 2002, 89p.

MOURE, A.; CRUZ, J.M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J.M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M.J.; PARAJÓ, J.C. Natural antioxidants form residual sources. *Food Chemistry* 2001, 72, 145-171.

MUNDO, M.A.; PADILLA-ZAKOUR, O.I.; WOROBO, R.W. Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *International Journal of Food Microbiology* 2004; in press (Partially funded by the National Honey Board).

MUNÓZ, O.; COPAJA, S.; SPEISKY, H.; PEÑA, R.C.; MONTENEGRO, G. Contenido de flavonoides y compuestos fenolicos de mieles chilenas e indice antioxidante. *Quimica Nova* 2007, 30 (4), 848-851.

NARAYANA, K.R.; REDDY, M.S.; CHALUVADI, M.R.; KRISHNA, D.R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology* 2001, 33, 2-16.

NIJVELDT, R.J.; NOOD, E.V.; HOORN, D.E.C.V.; BOELEN, P.G.; NORREN, K.V.; LEEUWEN, P.A.M.V. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal Clinical Nutrition* 2001, 74, 418-425.

Official Methods of Analysis of the AOAC, Seventh edition, 1950.

O MEL e as Abelhas. *Revista Brasileira de Agropecuária*. São Paulo, n. 15, p. 9-11, 2003.

OSAWA, T.; NAMIKI, M.; KAWAKISHI, S. Role of dietary antioxidants in protection against oxidative damage. *Basic life sciences* 1990, 52, 139-53.

OUCHEMOUKH, S.; LOUAILECHE, H.; SCHWEITZER, P. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys. *Food Control* 2007, 18, 52–58.

PAGANGA, G.; AL-HASHIM, H.; KHODR, H.; SCOTT, B.C.; ARUOMA, O.I.; HIDER, R.C.; HALLIWELL, B.; RICE-EVANS, C.A. Mechanisms of antioxidant activities of quercetin and catechin. *Redox Report* 1996, 2(6), 359-364.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. Estudo da composição fenólica de méis e própolis oriundos de mesma colméia. *Revista Mensagem Doce* 2003, São Paulo - SP, p. 1–11.

PARR, A.J. & BOLWELL, G.P. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenol content or profile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000, 80, 985-1012.

PAVIA, D. & LAMPMAN, K.G. *Ultraviolet spectroscopy. In: Introduction to spectroscopy – a guide for students of organic Chemistry*. Saunders College Publishing/Holt Rinehart and Winston. 1979, p.183-224.

PÉREZ, R. A.; IGLESIAS, M. T.; PUEYO, E.; GONZÁLEZ, M.; DE LORENZO, C. Amino Acid Composition and Antioxidant Capacity of Spanish Honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, 55, 360-365.

PERIS, J. Producción y comercio de los productos apícolas en España. El Campo del Banco de Bilbao. *Apicultura* 1984, 93.

PERSANO ODDO, L. & RICCIARDELLI D'ALBORE, G. Nomenclatura melissopalínológica. *Apicultura* 1989, 5, 63-72.

POLLONIO, M.A.R. Alimentos funcionais: as recentes tendências e os envolvidos no consumo. *Higiene Alimentar* 2000, 14, 26-31.

PRIOR, R.L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *American Journal Clinical Nutrition* 2003, 78 (suppl), 570S-578S.

RACOWSKI, I.; CIANGA SILVAS, F.P.; TAKUSHI, D.T.T.; DA SILVA, D.W.G.; MIRANDA, P. dos S. Ação antimicrobiana do mel em leite fermentado. *Revista Analytica* 2007, 30, 106-115.

RASMUSSEN, C.N.; WANG, X.H.; LEUNG, S.; ANDRAE-NIGHTINGALE, L.M.; SCHMIDT, S.J.; ENGESETH, N.J. Selection and Use of Honey as an Antioxidant in a

French Salad Dressing System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008, 56, 8650–8657.

RIBEIRO-CAMPOS, M.G.; SABATIER, S.; AMIOT, M.J.; AUBERT, S. Characterization of flavonoids in three hiveproducts: bee pollen, própolis and honey. *Planta Médica* 1990, 56, 580-581.

SAÁ-OTERO, P.; DÍAZ, E.; GONZÁLEZ, A.V. Estudio estadístico de representatividad de los datos obtenidos en análisis polínicos de mieles de Orense (Espanã). *Boletín de la Real Sociedad Espanõla de Historia Natural (Sección Biología)* 1993, 90, 5–16.

SABATIER, S.; AMIOT, M.J.; TACCHINI, M.; AUBERT, S. Identification of flavonoids in sunflower honey. *Journal of Food Science* 1992, 57 (3), 773-777.

SAKAKIBARA, H.; YOSHINORI, H.; NAKAGAWA, S.; ASHIDA, H.; KANAZAWA, K. Simultaneous determination of all polyphenol in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003, 51, 571-581.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos. Actividad antioxidante. *Alimentaria* 2002, v.1, p. 29-40.

SANCHO, M.T.; MUNIATEGUI, S.; HUIDOBRO, J.F.; LOZANO J.S. Aging of honey. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1992, 40,134-138.

SAWYER, R.W. Melissopalynology in the determination of the geographical and floral origin of honey. *Journal of the Association of Public Analysis* 1975, 13, 64-71.

SCALBERT, A. & WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition* 2000, 130, p. 2.073S-2.085S.

SIDDHURAJU, P. & BECKER, K. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chemistry* 2007, 101, 10-19.

SIMÕES, C. M. O. SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia - Da Planta ao Medicamento*. Editora Universidade UFRG/Ed. Da UFSC, 2000.

STEEG, E. & MONTAG, A. Quantitative determination of aromatic carboxylic acids in honey. *Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 1988, 187, 115-120.

STRINSON, E.E.; SUBES, M.H.; PETTY, J.; WHITE, J.W.; JR. The composition of honey. V. Separation and identification of the organic acids. *Arch. Biochemistry Biophys* 1960, 89, 6-12.

SUOLINA, M.; BUCHSBAUM, R.N.; RACKER, E. Effect of flavonoids on aerobic glycolysis and growth of tumor cells. *Cancer Research* 1975, 35, 1865-1872.

TAN, S.T.; WILKINS A.L.; MOLAN, P.C.; HOLLAND, P.T.; REID, M. A chemical approach to the determination of floral sources of New Zealand honeys. *Journal of Apicultural Research* 1989, 28(4), 212-222.

TAN, S.T.; WILKINS, A.L.; HOLLAND, P.T.; McGHIE, T.K. 1.Extractives from New Zealand unifloral honeys. 2.Degraded carotenoids and other substances from heather honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1989a, 37(5), 1217-1221.

TAORMINA, P.J.; NIERMIRA, B.A.; BEUCHAT, L.R. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *Int. Journal Food Microbiology* 2001, 69, 217-225.

TERRAB, A.; DÍEZ, M.J.; HEREDIA, F.J. Palynological, physico-chemical and colour characterization of Moroccan honeys: I. River red gum (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh) honey. *International Journal of Food Science and Technology* 2003, 38, 379-386.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; FERRERES, F.; BLÁZQUEZ, A.; GARCÍA-VIGUERA, C.; TOMÁS-LORENTE, F. High-performance liquid chromatography of honey flavonoids. *Journal of Chromatography* 1993, 634, 41-46.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A; FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C.; TOMÁS-LORENTE, F. Flavonoids in honey of different geographical origin. *Zeitschrift-fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 1993a, 196, 38-44.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A; FERRERES, F.; TOMÁS-LORENTE, F.; GARCÍA-VIGUERA, C. Hesperetin: A marker of the floral origin of citrus honey. *Journal Science Food Agric.* 1993b, 61, 121-123.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; FERRERES, F.; GINER, J.M. A comparative study of hesperetin and methyl anthranilate as markers of the floral origin of citrus honey. *Journal Science Food Agric.* 1994, 65, 371-372.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; MARTOS, I.; FERRERES, F.; RADOVIC, B.S.; ANKLAM, E. HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys *Journal Science Food Agric.* 2001, 81, 485-496.

TSIMOGIANNIS, D.I. & OREOPOULOU, V. The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3',4'-hydroxy substituted members. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2006, 7, 140-146.

TURNER, F.J. Hydrogen peroxide and Other Disinfectants – 3rd ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1983.

WAHDAN, H. Causes of the antimicrobial activity of honey. *Infection* 1998, 26, 26.

WANWIMOLRUK, S.; HO, P.; SAVILLE, D.J. Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds. *Journal Pharm. Pharmaceut. Science* 2001, 4(3), 217-227.

WESTON, R.J.; MITCHELL, K.R.; ALLEN, K.L. Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey. *Food Chemistry* 1999, 64 (3), 295-301.

WESTON, R. J.; BROCKLEBANK, K. L.; LU, Y. Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys. *Food Chemistry* 2000, 70, 427-35.

WHITE, J.W.Jr.; SUBERS, M.H.; SCHEPARTZ, A.I. The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochimica et biophysica acta* 1963, 73, 57-70.

WHITE, J.W. *Composition of honey*. In: CRANE, E. Honey. A comprehensive survey. 1979. London: Heinemann, p. 157-207.

WILLIAMS, D.H. & FLEMING, I. *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*. McGraw-Hill, 5th ed. 1995, p. 329.

WINTER, F. C-ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 1989, 55(5), 1203-1208.

WOISKY, R. G. *Dissertação de Mestrado*. Métodos de controle químico de amostras de própolis. Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP. 1996, p. 74.

WOISKY, R. G. & SALATINO, A. Analysis of propolis: parameters and procedures for chemical quality control. *Journal Apiculture Research* 1998, no prelo.

WOOTON, M.; EDWARDS, R.A.; FARAJI-HAREMI, R. Effect of accelerated storage conditions on the chemical composition and properties of australian honeys. 2. Changes in sugar and free amino acid contents. *Journal of Apicultural Research* 1976, 15(1), 29-34.

WU, T.W.; ZENG, L.H.; WU, J.; FUNG, K.P. Morin: A wood pigment that protects three types of human cells in the cardiovascular system against oxyradical damage. *Biochemical Pharmacology* 1994, 47, 1099-1103.

YAO, L.; JIANG, Y.; SINGANUSONG, R.; DATTA, N.; RAYMONT, K. Phenolic acids and abscisic acid in Australian *Eucalyptus* honeys and their potential for floral authentication. *Food Chemistry* 2004, 86, 169-177.

YAO, L.; JIANG, Y.; D'ARCY, B.; SINGANUSONG, R.; DATTA, N.; CAFFIN, N.; RAYMONT, K. Quantitative high-performance liquid chromatography analyses of flavonoids in Australian *Eucalyptus* honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004a, 52, 210-214.

YAO, L.; JIANG, Y.; SINGANUSONG, R.; DATTA, N.; RAYMONT, K. Phenolic acids in Australian Melaleuca, Guioa, Lophostemon, Banksia and Helianthus honeys and their potential for floral authentication. *Food Research International* 2005, 38, 651-658.

ZWAENEPREL, C. Honey: facts and folklore. *Alberta Beekeepers' Association* 1984, Edmonton, Canada, p. 24.

10 – ANEXOS

- Anexo 1



Quim. Nova, Vol. 31, No. 6, 1472-1475, 2008

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA MORINA EM MEL BRASILEIRO DE *Apis mellifera*

Regina Lucia Pelachim Lianda e Rosane Nora Castro*

Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Antiga Rodovia Rio-São Paulo, BR 465, km 07, 23.890-000 Seropédica – RJ, Brasil

Recebido em 23/10/07; aceito em 27/3/08; publicado na web em 1/9/08

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF MORIN IN BRAZILIAN HONEY FROM *Apis mellifera*. The flavonoid fraction was purified by a combination of chromatography on Amberlite XAD-2 and preparative silica gel TLC. Morin (3, 5, 7, 2', 4'-pentahydroxyflavone) was the only flavonol found in honey from Brazilian *Citrus* sp.. The structure of morin was determined on the basis of UV and ^1H and ^{13}C NMR spectral data together with literature references. This is the first report on the isolation of morin from Brazilian *Citrus* honey.

Keywords: Brazilian honey; morin; *Apis mellifera*.

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA MORINA EM MEL BRASILEIRO DE *Apis mellifera*

Regina Lucia Pelachim Lianda e Rosane Nora Castro*

Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Antiga Rodovia Rio-São Paulo, BR 465, km 07, 23.890-000 Seropédica - RJ, Brasil

Recebido em 23/10/07; aceito em 27/3/08; publicado na web em 1/9/08

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF MORIN IN BRAZILIAN HONEY FROM *Apis mellifera*. The flavonoid fraction was purified by a combination of chromatography on Amberlite XAD-2 and preparative silica gel TLC. Morin (3, 5, 7, 2', 4'-pentahydroxyflavone) was the only flavonol found in honey from Brazilian *Citrus* sp.. The structure of morin was determined on the basis of UV and ^1H and ^{13}C NMR spectral data together with literature references. This is the first report on the isolation of morin from Brazilian *Citrus* honey.

Keywords: Brazilian honey; morin; *Apis mellifera*.

INTRODUÇÃO

O mel é uma mistura de substâncias produzida pelas abelhas (no Brasil, *Apis mellifera*) a partir da coleta do néctar das flores ou de secreções de partes de plantas ou de excreções de insetos que sugam partes das plantas, e que se transformam e combinam com as substâncias específicas de seus próprios organismos. Apesar de o mel ser basicamente uma solução saturada de açúcares e água, seus outros componentes, aliados às características da fonte floral que o originou, conferem-lhe um alto teor nutritivo e propriedades medicinais. Além dos açúcares destacam-se os aminoácidos, enzimas, proteínas, sais minerais, vitaminas e substâncias fenólicas.¹ Apesar dos carboidratos encontrados no mel serem objetos de diversas revisões,² outros componentes presentes não foram extensivamente estudados, como por exemplo, os compostos fenólicos. Seu aroma, paladar, coloração, viscosidade e propriedades medicinais estão diretamente relacionadas com a fonte de néctar que o originou e também com a espécie de abelha que o produziu.³ A composição química do mel depende, em grande parte, das espécies vegetais visitadas pelas abelhas, natureza do solo, raça das abelhas e condições climáticas. Levando-se em conta a grande variedade do clima e da flora, extremamente ricas, encontradas no Brasil, a produção de mel e sua composição merecem especial atenção. Características físico-químicas, tais como, consistência, cor, odor, sabor e aromas, geralmente mantêm-se constantes e ocorrem somente em méis chamados monoflorais ou uniflorais, isto é, aqueles procedentes do néctar de uma espécie vegetal predominante, por exemplo, mel de laranjeiras, mel de eucalipto, etc. Estes méis são cada vez mais procurados pelo consumidor.³

As substâncias fenólicas contidas no mel podem ser oriundas do néctar coletado pelas abelhas, do pólen ou, ainda, da própolis. Muitas dessas substâncias, principalmente os ácidos fenólicos e flavonóides, são conhecidas por apresentarem propriedades farmacológicas e tornaram-se alvos de estudo, devido a sua conhecida ação sobre numerosos processos fisiológicos no corpo, podendo beneficiar o coração, veias, fígado, sistema imunológico, rins, musculatura e sistema nervoso.^{4,5} Das várias propriedades terapêuticas atribuídas a essas substâncias, podem se destacar os efeitos antioxidantes, antibacterianos, anti-álérgicos, anti-inflamatórios, etc.⁶

Neste trabalho é descrito o isolamento e a determinação estru-

tural da morina (I), oriunda de uma amostra de mel de laranjeiras (monofloral).

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos experimentais gerais

Os espectros obtidos na região do ultravioleta-visível foram registrados em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV mini 1240, utilizando como solvente metanol grau espectroscópico.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em espectrômetro Brüker, modelo AC-200, operando a 200 MHz para RMN ^1H e a 50 MHz para RMN ^{13}C , com as amostras solubilizadas em DMSO- d_6 e usando o tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os deslocamentos químicos (δ) foram obtidos em ppm (ppm) e as constantes de acoplamento (J) foram medidas em Hertz (Hz).

Nas análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatofolhas de alumínio contendo gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck), e revelação com luz ultravioleta (254 e 366 nm) e/ou nebulização com solução 1% de AlCl_3 em etanol, seguida de aquecimento. Para a análise dos flavonóides não-glicosilados o sistema de solvente usado foi uma mistura de hexano:acetato de etil:ácido fórmico (19:20:1) e para os flavonóides glicosilados o sistema de solvente usado foi uma mistura de clorofórmio:metanol:ácido fórmico (30:18:1).

Na separação por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foi utilizada placa de vidro 20 x 20 cm recoberta com gel de sílica com indicador de fluorescência (F₂₅₄ Merck), e para a eluição uma mistura de hexano:acetato de etil:ácido fórmico (15:24:1). Todos os solventes utilizados foram de pureza analítica ou grau espectroscópico.

Os padrões utilizados para as análises por cromatografias de camada delgada foram sempre de grau de pureza elevado (99%). Os flavonóides quercetina, morina, hesperidina, rutina foram obtidos da Merck. A miricetina foi isolada no Laboratório Químico de Produtos Naturais (DEQUIM-UFRJ). As soluções dos padrões foram preparadas a 1% em metanol (grau espectroscópico) e utilizadas como solução estoque padrão.

Amostra de mel

A amostra de mel de laranjeiras (*Citrus* sp, codificada de RLL06) foi coletada da região de Mata Atlântica e adquirida diretamente do

*e-mail: nora@ufrj.br

apicultor, em março de 2004, na cidade de Taubaté-SP. A identificação da fonte floral foi baseada nas propriedades sensoriais, tais como, aroma, paladar e cor do mel; a localização das colméias; a estação na qual o mel foi coletado e vegetação nas proximidades. A amostra foi estocada na geladeira a 4 °C até o momento da análise, a fim de evitar qualquer tipo de alteração.

Extração e isolamento das substâncias fenólicas do mel

As substâncias fenólicas foram extraídas do mel segundo adaptação⁷ à metodologia descrita na literatura.⁸ A amostra de mel de laranjeiras RLL06 (50 g) foi misturada com 250 mL de água destilada, acidificada a pH 2 com HCl concentrado e agitada com agitador magnético, a temperatura ambiente, até completa dissolução. A amostra fluída foi, em seguida, filtrada através de algodão para eliminar possíveis partículas suspensas. O filtrado foi então agitado com cerca de 75 g de Amberlite XAD-2 (tamanho do poro 9 nm e partícula 0,3-1,2 mm, Fluka), e, em seguida, empacotado em uma coluna de vidro (45 x 3,5 cm). A coluna foi então lavada primeiramente com uma solução ácida (pH 2 com HCl concentrado, 100 mL), e em seguida com água destilada (150 mL) para remover todos os açúcares e outros compostos polares, enquanto as substâncias fenólicas presentes no mel permaneceram na coluna. A fração fenólica adsorvida na coluna foi então eluída com metanol (~ 250 mL). O extrato metanólico obtido foi concentrado à pressão reduzida em um evaporador rotatório a 40 °C. O resíduo foi dissolvido em 15 mL de água destilada, e extraído com acetato de etila (5 x 10 mL). As fases orgânicas foram reunidas, secas com sulfato de sódio anidro, concentradas a pressão reduzida, e dissolvidas em metanol para serem analisadas por CCD e depois aplicadas em CCDP.

O extrato de acetato de etila obtido da amostra RLL06 (70 mg) foi purificado através de CCDP e eluído com hexano:acetato de etila:ácido fórmico (15:24:1). Após a eluição a placa foi visualizada na lâmpada a 254 e 366 nm, respectivamente, para auxiliar a retirada da substância de interesse da placa. O material foi raspado da placa, misturado com 20 mL de metanol, deixado agitar por 30 min e filtrado em papel de filtro. Em seguida, o metanol foi evaporado até a secura e forneceu 5,6 mg do flavonóide 1 (morina, Figura 1) como um sólido de coloração amarelo-castanho, que apresentou característica de uma substância pura por CCD.

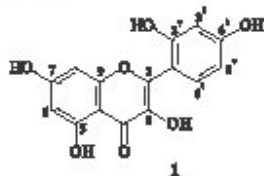


Figura 1. Substância isolada do mel de laranjeira de *Apis mellifera*

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amostra do mel de laranjeiras (RLL06) foi submetida ao fracionamento em coluna de Amberlite XAD-2 com metanol. O extrato metanólico foi analisado por CCD e as frações de similares fatores de retenção (R_f), comparadas com o padrão autêntico da morina, foram reunidas. A análise destas frações revelou claramente a presença do flavonol 1 através da observação do mesmo fator de retenção ($R_f=0,44$), bem como pelo aparecimento da coloração amarelo fluorescente a 366 nm, após revelação com $\text{AlCl}_3\cdot\text{EtOH}$ (1%) e aquecimento, sendo isto um indicativo para flavonóides com grupo hidroxila no carbono cinco.⁹

A partir destas observações foi realizado o isolamento da morina (1) por cromatografia de camada fina preparativa e a sua estrutura foi identificada com base nas análises dos espectros de UV e RMN.

A análise dos espectros de absorção no ultravioleta, com varredura na faixa de λ 200-500 nm, do padrão em comparação com a substância 1 isolada, forneceu considerações importantes sobre a posição dos grupamentos hidroxilas presentes no esqueleto flavônico, particularmente pela análise da banda I. A análise do espectro no UV de 1 em metanol permitiu observar dois máximos de absorção em $\lambda_{\text{máx}}$ 256 e 368 nm que caracterizam a banda II (absorção do anel A, sistema benzofila) e a banda I (anel B, sistema cinamoila), respectivamente, sendo compatível com um flavonol.⁹

O uso de cloreto de alumínio (AlCl_3) auxiliou na determinação espectrofotométrica da presença de hidroxilas "peri" e "orto", características de alguns flavonóides, por formar complexos estáveis, e promover desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção.⁹ Desta forma, a determinação das estruturas de flavonóides torna-se possível, pois ao formar complexos com o cloreto de alumínio possibilitam a sua diferenciação das outras substâncias fenólicas que estão presentes no mel, principalmente os ácidos fenólicos, pois estes, apesar de formarem complexos com cloreto de alumínio, absorvem em comprimentos de onda menores.³⁰

Nota-se que com a adição de AlCl_3 formou-se um complexo flavonóide-Al que absorveu em comprimento de onda bem maior que o flavonóide sem a presença deste aditivo. A adição de AlCl_3 provocou um deslocamento batocrômico nas bandas I e II, onde ocorreu a formação de um anel de seis membros estável através do átomo de alumínio com a hidroxila em C-5 e o grupo carbonila em C-4, resistente à ação de HCl. Já uma hidroxila em C-3, por se tratar de uma hidroxila tipo enólica, pode formar também ligação de hidrogênio intramolecular, porém em anel de cinco membros menos resistente à adição de HCl. Logo após a adição da solução de HCl, observou-se que o complexo que envolve o grupo carbonila em C-4 e o grupo hidroxila em C-5 apresentou-se estável pela quase manutenção do comprimento de onda da banda II (anel A), porém o complexo formado com a hidroxila em C-3 revelou deslocamento hipsocrômico da banda I (anel B) em relação à amostra com AlCl_3 . A Figura 2 apresenta os espectros da amostra 1 em metanol, após a adição de AlCl_3 e depois da adição de solução 15% de HCl, confirmando ser a estrutura da 3,5,7,2',4'-pentaidroxilflavona ou morina (Figura 2).

O flavonol morina (1) foi identificado também, através das análises de RMN de ^1H e ^{13}C unidimensional em comparação com os

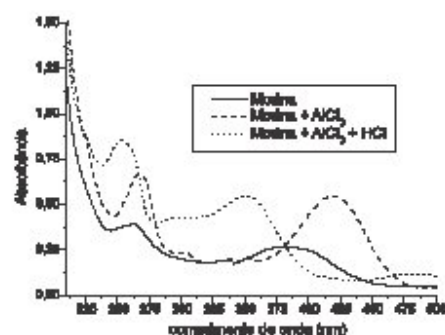


Figura 2. Espectros de absorção no UV (200-500 nm) para: morina 1 em metanol (—); morina 1 com AlCl_3 (---) e após adição de HCl (....)

dados descritos na literatura.¹¹⁻¹³

A análise do espectro de RMN ¹H da substância **1** permitiu identificar sinal de hidroxila δ_H 12,61 ppm, confirmando a presença do hidrogênio do grupo hidroxila, localizada no átomo de carbono C-5, envolvido em ligação de hidrogênio intramolecular com a carbonila em C-4. Na região de deslocamento químico dos hidrogênios aromáticos foram observados dois dubletes centrados em δ_H 6,15 ppm (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-6) e δ_H 6,27 ppm (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-8) presente no anel A. Além desses sinais, foram observados outros três sinais em δ_H 6,35 ppm (1H, dd, $J = 2,2$ Hz, H-5'-3' e $J = 8,4$ Hz, H-5'-6'); 6,41 ppm (1H, d, $J = 2,2$ Hz, H-3') e 7,21 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-6') relacionados ao sistema ABC do anel aromático B trissubstituído (Tabela 1).

Tabela 1. Dados de RMN ¹H e ¹³C da substância **1** (DMSO-*d*₆) comparados com os dados da literatura para a morina¹². Deslocamentos químicos em δ_H e δ_C (ppm) e constantes de acoplamento (J , entre parênteses) em Hz

Substância 1		Morina	
δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
2	148,2		149,0
3	139,8		136,3
4	176,4		176,2
5	OH -12,61(s)	OH - 12,83 (s)	160,9
6	6,15 (d; 2,0)	6,17 (d; 1,7)	98,0
7			163,7
8	6,27 (d; 2,0)	6,28 (d; 1,7)	93,4
9			156,8
10	105,1		103,6
1'	110,8		109,3
2'	156,9		156,9
3'	6,41 (d; 2,2)	6,38 (d, $J = 2,1$)	103,0
4'	159,7		160,5
5'	6,35 (dd; 8,4; 2,2)	6,33 (dd; 8,3; 2,1)	106,8
6'	7,21 (d; 8,4)	7,22 (d; 8,3)	131,7

multiplicidade: s = singlete; d = dublete; dd = duplo dublete

A substância **1** exibiu no espectro de RMN ¹³C quinze sinais na região de carbonos sp², compatíveis com a unidade C₆-C₇-C₈ característica de flavonóides. Além disso, foi possível identificar a presença de cinco carbonos contendo grupos hidroxilas (C-3, C-5, C-7, C-2' e C-4'). O deslocamento químico do sinal da carbonila a δ_C 176,4 ppm foi influenciado pela ligação intramolecular com o hidrogênio do grupo OH na posição 5 (hidroxila "peri"). A comparação dos dados espectroscópicos obtidos para a substância **1** com os registrados na literatura permitiu a identificação deste constituinte como sendo a morina.¹¹⁻¹³ (Tabela 1).

Os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ¹H e ¹³C, bem como a análise no UV permitiram determinar a estrutura de **1** como 3,5,7,2',4'-pentaidroxi-flavona ou morina.

Embora tenha sido relatada na literatura a presença da flavanona hesperitina em mel europeu de laranjeiras,¹⁴ até então, a morina nunca havia sido isolada e identificada em méis europeus, apesar de ser um flavonóide largamente distribuído entre frutas e vegetais. De acordo com relatos da literatura, sabe-se que para os méis de laranjeiras, a análise polínica não é simples como nos casos dos outros méis uni-

florais, devido ao fato de que a quantidade de pólen presente neste mel é pequena e geralmente muito variada.¹⁵ Diferentes espécies de plantas produzem quantidades de pólen diferentes, que podem variar de estação para estação. Sendo assim, o mel pode apresentar os grãos de pólen provenientes, na sua maior parte, das plantas fornecedoras de néctar, as chamadas plantas nectaríferas; bem como das chamadas plantas poliníferas que, além de pouco néctar, fornecem bastante pólen. Certa percentagem do pólen no mel pode ainda ser proveniente de plantas anemófilas, isto é, cujas flores não produzem néctar, somente pólen o qual é disperso pelo vento e as abelhas podem aproveitá-lo como fonte de proteínas.³ Na prática não é possível se obter um mel 100% monofloral, ou seja, isento de grãos de pólen de outros espécimes.

Uma possível razão para se justificar a presença da morina em mel *Citrus* sp. que foi coletado na região de Mata Atlântica, pode ser em virtude da existência de várias espécies nativas e abundantes na região de coleta do mel; como no caso a presença de *Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudich, que já foi estudada e revelou a presença da morina em sua composição química.¹⁶

Este trabalho descreve pela primeira vez o isolamento e a identificação da morina em mel brasileiro de laranjeiras. Outros méis de laranjeiras da região da Mata Atlântica já haviam sido estudados e revelaram a presença desta substância por cromatografia líquida de alta eficiência.⁷

AGRADECIMENTOS

Aos órgãos de fomento CAPES, FAPERJ, CNPq pela bolsa concedida e pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento dessa pesquisa, e ao Prof. Dr. M. G. de Carvalho pelo fornecimento do padrão de miricetina.

REFERÊNCIAS

- Crane, E.; *O livro do mel*, 2ª ed., Nobel: São Paulo, 1985.
- Siddiqui, I. R.; *Advanc. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1970**, *25*, 285; Mendes, E.; Proença, E. B.; Ferreira, I. M. P. L. V. O.; Ferreira, M. A.; *Carbohydr. Polym.* **1998**, *37*, 219.
- Barth, O. M.; *Scientia Agrícola* **2004**, *61*, 342.
- Muñoz, O.; Copaja, S.; Speisky, H.; Peña, R. C.; Montenegro, G.; *Quím. Nova* **2007**, *30*, 841.
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémy, C.; Jiménez, L.; *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 727; Yao, L.; Jiang, Y.; Singanurong, R.; Datta, N.; Raymont, K.; *Food Chem.* **2004**, *86*, 169; Martos, I.; Ferreres, F.; Tomás-Barberán, F. A.; *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1498; Martos, I.; Cossentini, M.; Ferreres, F.; Tomás-Barberán, F. A.; *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2824; Tomás-Barberán, F. A.; Ferreres, F.; Blázquez, A.; García-Viguera, C.; Tomás-Lorente, F.; *J. Chromatogr.* **1993**, *634*, 41; Ferreres, F.; Ortiz, A.; Silva, C.; García-Viguera, C.; Tomás-Barberán, F. A.; Tomás-Lorente, F.; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, *194*, 139; Sabatier, S.; Amiot, M. J.; Tacchini, M.; Aubert, S.; *J. Food Sci.* **1992**, *57*, 773; Amiot, M. J.; Aubert, S.; Gonnet, M.; Tacchini, M.; *Apidologie* **1989**, *20*, 115.
- Nazime, M.; Aykut, G.; Celik, A.; Katircioglu, H.; *Nat. Prod. Res.* **2007**, *21*, 187; Brudzynski, K.; *Can. J. Microbiol.* **2006**, *52*, 1228; Kampa, M.; Alexaki, V. I.; Notas, G.; Nifli, A. P.; Nistakaki, A.; Hatzoglou, A.; Bakogeorgou, E.; Koumtzoglou, E.; Blekas, G.; Boskou, D.; Gravanis, A.; Castanas, E.; *Cancer Res.* **2004**, *6*, 63; Aljadi, A. M.; Kamaruddin, M. Y.; *Food Chem.* **2004**, *85*, 513; Aljadi, A. M.; Kamaruddin, M. Y.; *Turk. J. Med. Sci.* **2003**, *33*, 229; Campos, M. G.; Webby, R. F.; Markham, K. R.; Mitchell, K. A.; Da Cunha, A. P.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 742; Miorin, P. L.; Junior, N. C. L.; Custodio, A. R.; Bretz, W. A.; Marcucci, M. C.; *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *95*, 913; Prior, R. L.; *Am. J.*

- Clin. Nutr.* 2003, 78, 570S; Al-Mamary, M.; Al-Meer, A.; Al-Haberi, M.; *Nutr. Rev.* 2002, 22, 1041; Nijveldt, R. J.; Nood, E. V.; Hoon, D. E. C. V.; Boelens, P. G.; Norren, K. V.; Leeuwen, P. A. M. V.; *Am. J. Clin. Nutr.* 2001, 74, 418.
7. Lianda, R. L. P.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 2004.
8. Baltrušaitytė, V.; Venskutonis, P. R.; Ceksterytė, V.; *Food Chem.* 2007, 101, 502; Fiorani, M.; Accorsi, A.; Blasa, M.; Diamantini, G.; Piatì, E.; *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 8328; Tomás-Barberán, F. A.; Martos, I.; Ferreres, F.; Radovic, B. S.; Anklam, E.; *J. Sci. Food Agric.* 2001, 81, 485; Ferreres, F.; Tomás-Barberán, F. A.; Giner, J. M.; *J. Sci. Food Agric.* 1994, 65, 371; Martos, I.; Ferreres, F.; Tomás-Barberán, F. A.; *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 1498.
9. Mabry, T. J.; Markham, K. R.; Thomas, M. B.; *The Systematic Identification of Flavonoids*, University of Texas, Austin: New York, 1970.
10. Braz-Filho, R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1971; Markham, K. R.; *Techniques of Flavonoid Identification*, Academic Press: London, 1982; Harborne, J. B.; *The Handbook of Natural Flavonoids*, Wiley: Chichester, 1999.
11. Da Silva, T. M. S.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 2002.
12. Niassy, B.; Um, B. H.; Lobstein, A.; Weniger, B.; Koné, M.; Anton, R.; *C. R. Chimie* 2004, 7, 993.
13. Agrawal, P. K.; *Carbon-13 NMR of Flavonoids: Studies in Organic Chemistry* 39, Elsevier: Amsterdam, 1989.
14. Ferreres, F.; Tomás-Barberán, F. A.; Giner, J. M.; *J. Sci. Food Agric.* 1994, 65, 371. Ferreres, F.; Garcia-Viguera, C.; Tomás-Barberán, F. A.; Tomás-Lorente, F.; *J. Sci. Food Agric.* 1993, 61, 121.
15. Serra Bonvehí, J.; Gómez-Pajuelo, A.; Gonell-Galindo, F.; *Alimentaria* 1987, 185, 61.
16. Wu, T. W.; Zeng, L. H.; Wu, J.; Fung, K. P.; *Biochem. Pharmacol.* 1994, 47, 1099.

- Anexo 2



Serviço Público Federal
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Instituto de Zootecnia
Laboratório ABELHA-NATUREZA

ANÁLISE POLÍNICA DE MEL COMERCIAL

Objetivo: Verificar a dominância dos tipos polínicos de *Eucalyptus* (Myrtaceae) e de *Citrus* (Rutaceae) em amostras de méis comerciais.

Pedido feito por MSc. Regina Lucia Pelachim Lianda (Instituto de Química / UFRRJ)
Orientadora: Profa. Dra. Rosane Nora Castro (Instituto de Química / UFRRJ)

Resultados da análise polínica

Tabela 1. Amostras de méis de Eucalipto (n=3)

FLORADA AMOSTRA	Total de grãos de pólen	Total de grãos de pólen <i>Eucalyptus</i>	% de grãos de pólen <i>Eucalyptus</i>
RLE 34	2122	1780	83,9
RLE 35	4807	3767	78,4
RLE 36	3031	1729	57,04

Tabela 2. Amostras de méis de Laranjeira (n=14)

FLORADA AMOSTRA	Total de grãos de pólen	Total de grãos de pólen <i>Citrus</i>	% de grãos de pólen <i>Citrus</i>
RLL16	309	226	73,1
RLL18	450	286	63,5
RLL20	182	19	10,4
RLL22	516	266	51,5
RLL25	1614	293	18,1
RLL26	3	SEM PÓLEN	
RLL27	553	315	57
RLL28	931	668	71,7
RLL29	992	652	65,7
RLL30	1214	960	79,1
RLL31	504	378	75
RLL32	601	539	89,7
RLL40	517	355	68,7
RLL41	562	275	49

De acordo com a análise polínica, todas as amostras de eucalipto (Tabela 1) apresentaram como dominância (> 45%) os grãos de pólen de *Eucalyptus* sp. (Myrtaceae), com indicação de méis de eucalipto para todas as amostras avaliadas.

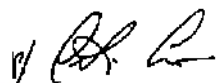
Nas amostras de laranjeira (Tabela 2) os grãos de pólen de *Citrus* sp. (Rutaceae) apresentaram em dominância (> 45%), com exceção das amostras RLL20 (3,2%) sendo considerado pólen isolado importante (entre 3 a 14%) e RLL25 (18,1%) sendo pólen acessório (entre 15 a 44%). A amostra RLL26 não apresentou pólen.

A amostra RLL20 apresentou grãos de pólen de *Cecropia* sp. (Moraceae) como dominante com 72,2%, mas este tipo polínico foi retirado da contagem total por ser considerado pólen anemófilo. O pólen de *Eucalyptus* sp. esteve presente na amostra com 30,8% considerado pólen acessório (entre 15 a 44%). Não ocorreu pólen dominante na amostra.

A amostra RLL25 não ocorreu tipo dominante, considerados grãos de pólen acessórios - *Mimosa scrabella* (Mimosaceae) (40,4%), *Citrus* sp. (Rutaceae), Asteraceae (17,9%) e *Eucalyptus* (Myrtaceae).

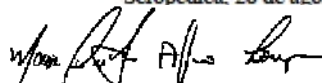
Referências

- BARTH, O.M. & MELHEM, T.S. (1988). Glossário ilustrado de palinologia. UNICAMP, Campinas.
- BARTH, O.M. (1989). O pólen no mel brasileiro. Rio de Janeiro: Gráfica Luxor.
- PUNT, W., HOEN, P.P., BLACKMORE, S., NILSSON, S. & LE THOMAS, A. (2007). Glossary of pollen and spore terminology. Review of Palaeobotany and Palynology, 143:1–81.



Dra. Leila Nunes Morgado
Pesquisadora responsável

Seropédica, 28 de agosto de 2008.



Profa. Dra. Maria Cristina A. Lorenzon
Coordenadora do Laboratório Abelha Natureza

IMAGENS

Amostra de *Eucalyptus*



Amostra de *Citrus*

